

SÉRIE A, N° 554
N° d'ordre
1279

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADÉ DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GEORGES ROSENTHAL

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

CHEF DE CLINIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES MICROBES ANAÉROBIES (CULTURE
ET AÉROBISATION).

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *11 oct* octobre 1907, devant la Commission d'examen

MM. G. BONNIER : *Président.*

GIARD..... }
HAUG..... } *Examineurs.*

PARIS

FÉLIX ALCAN, ÉDITEUR

ANCIENNE LIBRAIRIE GERMER BAILLIÈRE ET C^{ie}

108, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 108

1907

Tous droits de traduction et de reproduction réservés.

SÉRIE A, N° 554

N° d'ordre
1279

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GEORGES ROSENTHAL

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

CHEF DE CLINIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES MICROBES ANAÉROBES (CULTURE ET AÉROBISATION).

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le octobre 1907, devant la Commission d'examen

MM. G. BONNIER : *Président.*

GIARD..... }
HAUG..... } *Examineurs.*

PARIS

FÉLIX ALCAN, ÉDITEUR

ANCIENNE LIBRAIRIE GERMER BAILLIÈRE ET C^{ie}

108, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 108

1907

Tous droits de traduction et de reproduction réservés.



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen : P. APPELL, Professeur..... Mécanique rationnelle.

Doyen honoraire : G. DARBOUX, Professeur. Géométrie supérieure.

Professeurs honoraires : { L. TROOST.
CH. WOLF.
J. RIBAN.

<i>Professeurs :</i>	LIPPMANN.....	Physique.
	BOUTY.....	Physique.
	BOUSSINESQ.....	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD.....	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ.....	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	Y. DELAGE.....	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparées.
	G. BONNIER.....	Botanique.
	DASTRE.....	Physiologie.
	DITTE.....	Chimie.
	GIARD.....	Zoologie, Évolution des êtres organisés.
	KOENIGS.....	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN.....	Géographie physique.
	GOUSAT.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	CHATIN.....	Histologie.
	PELLAT.....	Physique.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET.....	Physique —
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER.....	Astronomie physique.
<i>Prof. adjoints :</i>	PAINLEVÉ.....	Mathématiques générales.
	HAUG.....	Géologie.
	N.....	Physique.
	TANNERY.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	RAFFY.....	Application de l'Analyse à la Géométrie.
	HOUSAY.....	Zoologie.
	N.....	Chimie.
	N.....	Chimie biologique.
	N.....	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparées.
	PUISEUX.....	Mécanique et Astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	HADAMARD.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	MATRUCHOT.....	Botanique.
	MICHEL.....	Minéralogie.
	DAGUILLON.....	Botanique.
	BOUVEAULT.....	Chimie organique.
	BOREL.....	Théorie des fonctions.
	PRUVOT.....	Anatomie comparée.
	CAULLERY.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).

Secrétaire : A. GUILLET.

L'AÉROBISATION

DES

MICROBES ANAÉROBIES

INTRODUCTION

PLAN DU TRAVAIL

Nous désirons dans ce travail exposer les recherches personnelles et originales que nous avons faites en étudiant depuis sept ans les microbes anaérobies. Cette classe de microbes est loin d'avoir conquis la place considérable qu'elle doit occuper par son importance biologique et en raison du grand nombre d'affections animales et humaines qu'elle détermine, ou dont elle dirige l'évolution. La technique classique, délicate et difficile, est cause en partie du petit nombre de recherches faites à ce sujet. Il nous a paru important d'établir une technique simple et rigoureuse, d'un emploi rapidement accessible à tous les travailleurs : le procédé de la boîte de Pétri, le tube cacheté, le tube cacheté étranglé répondent à ce desideratum. Mais le souvenir de nos études de zoologie et de botanique, l'enseignement de MM. Delage et Bonnier, la lecture des travaux du prof. Giard, certains faits partiels signalés dans différentes recherches de bactériologie nous amenèrent à penser que la fonction « anaérobiose » n'avait pas la valeur absolue que lui donnait encore la Bactériologie classique. Nos procédés de mensuration de l'anaérobiose, l'étude du tube profond, du tube étroit eurent vite fait de nous convaincre qu'il était facile de cul-

tiver au contact de l'air les microbes dits à tort avant nos recherches anaérobies stricts. L'aérobisation des anaérobies nous a amené à étudier la biologie des microbes ainsi adaptés à une nouvelle existence et à formuler des lois biologiques nouvelles. Enfin nous avons pu formuler une hypothèse rationnelle sur l'origine des anaérobies pathogènes et poser les bases d'une nouvelle méthode d'immunisation des animaux dont l'avenir nous dira la valeur, et dont ce travail rapporte les premières constatations. Ce travail sera divisé en trois parties. Dans la première partie, nous précisons notre technique; dans la deuxième partie, nous ferons le relevé des faits expérimentaux, qui se rapportent aux microbes étudiés; dans la troisième partie, nous dégagerons les faits généraux qui découlent des expériences faites. Une conclusion résumera en quelques propositions notre travail.

D'accord avec nos maîtres, nous avons dans cette étude fait une part minime à la bibliographie. Les procédés de culture des anaérobies sont largement décrits dans les traités classiques et rien n'eût servi d'en recopier la description. Quant à l'aérobisation, méthode nouvelle, elle ne comporte pas de recherche bibliographique; toutefois nous n'avons pas voulu passer sous silence les travaux de bactériologie qui présentent avec les nôtres une analogie même lointaine; nous signalons dès notre introduction les travaux de Tarozi qui postérieurement à nous a conçu un procédé de culture des anaérobies au contact de l'air.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE

A. — PROCÉDÉS DE CULTURE

Le problème bactériologique de l'étude des microbes anaérobies doit résoudre trois questions :

1° Étant donnée une humeur organique, par quel procédé peut-on isoler les microbes anaérobies, qu'elle est supposée contenir?

2° Les microbes étant isolés, quel est le procédé de culture le plus simple pour en faire l'étude?

3° Quelle technique devons-nous utiliser pour conserver des échantillons?

La réponse à ces trois questions est la suivante :

1° Le procédé le plus simple de séparation des microbes anaérobies est le tube de gélose profonde ou tube de Liborius-Veillon, à condition d'appliquer notre procédé de la boîte de Pétri.

2° Le tube de culture et d'étude des microbes anaérobies, une fois isolés, est notre tube cacheté, avec sa variété le tube cacheté étranglé et ses applications le ballon cacheté, le ballon cacheté étranglé. Sa rigueur est absolue malgré sa simplicité.

3° Le tube de conservation des microbes anaérobies est le tube imaginé par Achalme; nous en avons donné la première description dans notre thèse de doctorat en médecine.

Voici le mode de préparation de ces différents procédés de culture :

1° Description du tube de gélose profonde (Liborius-Veillon)¹. — Le procédé de la culture en gélose profonde a été décrit par Liborius en 1886 dans son mémoire intitulé : *Beiträge zur Kenntniss der Sauerstoff bedürfnisse der Bakterien* (*Zeitschrift für Hygiene*, Bd I). Malheureusement Liborius, pour isoler les colonies, expulsait le cylindre d'agar dans une boîte de Pétri; après un seul examen, la culture devait être rejetée et l'étude successive des colonies souvent longues à se développer devenait impossible. Veillon et son collaborateur Zuber imaginèrent le prélèvement des colonies à la pipette (*Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie*, *Archives de Médecine expérimentale*, juillet 1898).

Leur technique peut se terminer ainsi (voir fig. 1) :

On remplit d'une gélose bien transparente additionnée de glucose à la dose de 1 à 2 p. 100 de tubes à essai (22 cm. de long sur 15 mm. de diamètre) de manière que chaque tube contienne une colonne de 12 centimètres environ.

Au moment de l'ensemencement, on fait chauffer au bain-marie le nombre de tubes jugés nécessaires jusqu'à liquéfaction complète de la gélose. Les tubes sont alors mis à l'étuve à 40°, ou simplement mis au bain-marie dans l'eau maintenue tiède par la chaleur d'un petit brûleur de bec Bunsen.

Lorsque le tube pris à la main semble revenu à 40° ou même lorsque la joue peut supporter son contact, on ensemence dans un premier tube avec une pipette le produit à étudier, en ayant soin d'agiter la pipette au sein de la gélose. On prélève ensuite, avec une autre pipette, un peu de la gélose du tube n° 1 pour ensemencer le tube n° 2 et ainsi de suite. Il faut en dernier lieu mettre les tubes dans l'eau froide qui provoque la prise de la gélose, avant de les porter à l'étuve à 37°. Cette précaution n'est pas indispensable.

On examinera les tubes de jour en jour; on notera les caractères des colonies apparues, et on les isolera par la manœuvre suivante :

On a eu soin auparavant de préparer des pipettes longues à partie effilée rigide, ce qui est possible en utilisant des tubes de 6 mm. de diamètre. Il devient facile d'aller à « la pêche » des colonies même

1. Pour la technique générale des cultures des microbes anaérobies, voir Roux, *Annales de l'Institut Pasteur*, Macé, Besson, Bezançon. *Traité de Bactériologie*. les thèses de doctorat en médecine de Guillemot (1899), Rist (1898), Tissier, Hallé (1898), Cottet (1900), etc.

fines développées dans la gélose en se conformant aux recommandations de Guillemot (thèse p. 40). Un tube en caoutchouc souple de diamètre moyen, assez résistant, long de 40 centimètres, est fixé à la pipette par une extrémité, adapté par l'autre à un tube de verre de même diamètre qui est reçu dans la bouche. La colonie à prélever est repérée à la loupe : il suffit alors d'aller à sa recherche sous le contrôle de la vue avec la pipette époincée pénétrant dans la gélose. Une légère aspiration permet d'introduire la colonie dans l'effilure de la pipette. Cette colonie servira à ensemencer des tubes de gélose profonde préalablement fondus et maintenus à une température de 40°, comme il a été indiqué.

Les avantages de cette technique sont considérables : le tube, après prélèvement d'une ou de plusieurs colonies, n'a rien perdu de sa rigueur anaérobie, ni de sa pureté ; l'étude en séries de colonies à apparition successive ne présente aucune difficulté. Si quelques colonies seulement se sont développées, un premier repiquage donnera d'emblée une culture pure ; et la séparation se fera aisément. Il n'en est pas malheureusement de même dans les tubes initiaux riches en colonies : la pipette dans son passage peut se charger de germes étrangers à la colonie visée, d'où nécessité de faire de nouvelles manœuvres d'isolement avec les tubes de deuxième série, d'où obtention tardive des espèces pures, ayant perdu tout ou partie de leurs propriétés pathogènes. La technique de séparation risque de devenir tellement fastidieuse qu'elle écarte le bactériologue de pareilles recherches.

2° Pour remédier à ces inconvénients, nous avons imaginé le **procédé de la boîte de Pétri**, dont voici la description :

Dans la recherche à la pipette de la colonie à isoler, l'opérateur aura soin d'aspirer dans l'effilure de la pipette la colonie intacte, manœuvre facile avec les petites colonies, difficile avec les colonies vivaces. Cette manœuvre sera facilitée par le soin apporté à la confection des pipettes dont la partie effilée doit avoir une longueur maxima de 10 centimètres, et un diamètre de près de 1 mm. Nous recommandons également de briser l'extrémité de la pipette de manière à obtenir une section irrégulière et tranchante qui aide singulièrement la progression dans la gélose.

La pipette est retirée, elle contient dans sa partie effilée la colonie

à isoler : au lieu d'ensemencer immédiatement une nouvelle série de tubes de Liborius, il faut avoir soin de rejeter le minime cylindre de gélose à l'intérieur d'une boîte de Pétri, stérilisée précédemment au four Pasteur selon la méthode classique, et entourée de papier à filtre.

Dans la boîte de Pétri, la colonie servira à une double série de manœuvres. D'abord un lavage au bouillon stérile la débarrassera des germes accessoires ramassés par la pipette ; d'autre part, après isolement de son cylindre de gélose, le prélèvement d'une parcelle permettra avant l'ensemencement un examen microscopique. Le procédé de la boîte de Pétri donne rapidement des cultures pures, et contrôle rigoureusement l'isolement des colonnes fait autrefois moins exactement.

3° Tube cacheté. Tube cacheté étranglé. Ballon cacheté simple ou étranglé (fig. 2). — Le tube cacheté ramène la culture en milieu liquide des microbes anaérobies à la simplicité de culture des microbes aérobies. Voici la technique bien simple de sa préparation : des tubes à culture ordinaires sont remplis de bouillon d'eau peptonée, d'eau blanc d'œuf ou de lait comme s'il s'agissait de préparer les milieux ordinaires. Mais on verse dans chaque tube une légère quantité de lanoline fondue, de manière à surmonter la colonne liquide d'une bague d'un demi-centimètre de cette substance. On stérilise à l'autoclave, un quart d'heure à 120° comme si aucune addition de lanoline n'avait été effectuée. Retiré de l'autoclave, après refroidissement, le tube cacheté se présente comme un tube contenant une colonne de liquide rigoureusement emprisonné par la bague solidifiée de lanoline. Il serait impossible de distinguer un tube cacheté de bouillon, d'un tube de gélatine surmonté de lanoline ; le bouchon de lanoline adhère aux parois du verre, il ne laisse passer ni les liquides, ni les gaz, et cependant son emploi est des plus simples.

Prenez un tube cacheté par son extrémité inférieure, et présentez latéralement à la flamme du bec Bunsen la partie contenant le cylindre de lanoline, en roulant le tube entre les doigts. Rapidement, car la lanoline fond à 42°, la bague solide se liquéfie, le tube cacheté est devenu un tube liquide aussi facile à manipuler que le tube vulgaire de bouillon. Mais, fait de premier ordre, pendant

toute la série des manipulations, prises, réensemencements, additions, etc., qui doivent se faire à la pipette, la colonne liquide de lanoline interdit un contact quelconque entre l'air atmosphérique et le milieu. Les manœuvres terminées, il suffit de mettre le tube cacheté dans un verre rempli d'eau pour que la lanoline se reprenne; il est remis à l'étuve, n'ayant rien perdu de sa valeur. Il est évident que le tube cacheté ne supporte pas l'emploi du fil ordinaire de platine.

Le tube cacheté peut se conserver longtemps avant d'être utilisé. Toutefois, si des tubes préparés n'étaient pas utilisés dans un délai de 2 à 3 mois, nous conseillons de les soumettre à une nouvelle ébullition, ou mieux de les porter dans l'autoclave 5 minutes à 110°.

Nous avons contrôlé la valeur du tube cacheté par une double série d'expériences, destinées à vérifier la rigueur de son imperméabilité d'une part, la valeur de son anaérobiose de l'autre.

a. Sur la lanoline d'un tube de lait cacheté, on introduit à la pipette une petite quantité de culture sur lait de bactérium coli. Le lait sous-jacent à la lanoline n'est pas coagulé.

La même expérience renversée est également positive : une culture en lait cacheté de bactérium coli ne contamine pas du lait stérile recouvrant la bague de lanoline.

De même des tubes de lait cacheté sont conservés débouchés au laboratoire; le lait reste stérile. Une culture de moisissures versée sur la lanoline ne traverse pas la bague obturatrice.

b. Le tube cacheté est imperméable aux substances colorantes. Il l'est de dehors en dedans, car les solutions de thionine, fuchsine, bleu de méthylène, éosine, versées sur la bague de lanoline, ne la traversent pas. Il l'est également de dedans en dehors.

c. Le tube cacheté est imperméable aux produits chimiques; il ne laisse aucune réaction s'effectuer de dedans en dehors ou de dehors en dedans. Car des tubes cachetés remplis de liqueur de Gram, perchlorure de fer, acétate de plomb et amidon en solution aqueuse ont été respectivement recouverts de solution d'amidon, ferrocyanure de potassium, iodure de potassium, eau iodée. Aucune réaction chimique ne s'est effectuée.

d. Le tube cacheté est imperméable aux gaz. Malgré la colossale puissance de cet antiseptique, quelques gouttes de formol versées sur le bouchon d'ouate n'entravent pas les cultures en tubes

cachetés. Bien plus, les gaz produits dans les fermentations microbiennes repoussent la lanoline, mais ne la traversent pas. Ce phénomène nous a conduit à notre deuxième type de tube cacheté : le tube cacheté étranglé.

Les expériences suivantes, faites sous le contrôle de Nicloux, dans le laboratoire de M. le professeur Budin, d'après la méthode de notre maître Gréhan, établissent la faible teneur en oxygène de nos tubes.

a. Quatre tubes de lait cachetés contenant 32 cc. ont laissé, à la pompe à mercure, se séparer 2 cc. 35 de gaz, dont 1 cc. 95 de CO^2 (épreuve de la potasse) et 0 cc. 03 seulement d'oxygène dosé par l'acide pyrogallique).

b. Quatre tubes d'eau peptonée cachetés préparés par addition à des tubes d'eau peptonée bouillie d'une bague de lanoline (préparation en deux temps) contenaient 30 cc. de liquide. La pompe à mercure en extrait 0 cc. 6 de gaz dont 0 cc. 35 d'acide carbonique (épreuve de la potasse) et seulement des traces d'oxygène.

c. A titre de comparaison, nous avons vu que quatre tubes de gélose profonde de Liborius contenant 39 cc. 5 de gélose sucrée renfermaient 1 cc. 21 de gaz dont 0 cc. 73 de CO^2 et des traces d'oxygène.

Ces expériences démontrent scientifiquement et mathématiquement la rigueur de notre nouveau procédé de culture.

Aussi Besson dans son traité classique en a-t-il fait le procédé recommandé.

Cependant le tube cacheté tel que nous venons de le décrire a un inconvénient né d'ailleurs de sa rigueur : le dégagement considérable de gaz fréquent dans les cultures anaérobies peut projeter au loin lanoline et bouchon d'ouate; la culture est alors exposée à toutes contaminations.

Dans ce cas, d'ailleurs, la gélose profonde du tube Liborius éclate; le tube d'Achalme fait explosion, ainsi que Thiroloix l'a signalé dans ses recherches sur le sang des rhumatisants.

Il est facile dans notre technique de remédier à ces difficultés par l'emploi du tube cacheté étranglé.

Le tube cacheté étranglé est un tube ordinaire de culture dont la partie moyenne a été légèrement effilée à la flamme. Ce tube sera rempli de milieu liquide jusqu'à l'extrémité inférieure de la partie étranglée. La lanoline occupe la partie rétrécie sur une hauteur de

un demi à un centimètre. On stérilise à l'autoclave et on utilise comme un tube cacheté ordinaire.

Que produit le dégagement de gaz dû à la fermentation microbienne dans un semblable tube? Il occasionne le refoulement du bouchon de lanoline de la partie étroite du tube dans sa partie supérieure de diamètre ordinaire. Les gaz s'échappent, mais le bouchon d'ouate n'est ni expulsé ni atteint; le lendemain, un léger chauffage au brûleur Bunsen redissout aisément la lanoline et recachète le tube.

La projection de l'anneau de lanoline dans la partie large du tube, dira-t-on, enlève à la culture son caractère rigoureusement anaérobie. Cette objection est pratiquement sans valeur; la culture est protégée contre le contact atmosphérique par le dégagement incessant et l'expansion des gaz de fermentation; jamais nous n'avons observé d'arrêt ou de ralentissement de prolifération.

Est-il maintenant nécessaire de décrire longuement le ballon cacheté ou le ballon cacheté étranglé? Le procédé de la bague de lanoline est indépendant de la forme et de la capacité du tube, vase, ou ballon de culture. Le ballon cacheté est un ballon rempli d'un milieu liquide jusqu'à l'origine du col; une bague de lanoline surmonte le liquide. Le ballon cacheté étranglé contient le cylindre de lanoline dans une partie de son col préalablement étranglée.

A ce propos, il est nécessaire de faire une simple remarque de technique pratique.

Dans la préparation du ballon cacheté, le niveau du liquide devra dépasser de deux à trois centimètres la naissance du col; il en sera de même pour le ballon cacheté étranglé. Faute de cette précaution, la bague après stérilisation pourrait descendre dans la partie large du ballon; d'où nécessité d'ajouter à la pipette du bouillon ou du lait stérile, manipulation qui comporte toujours un certain risque d'infection.

Uniquement désireux de décrire nos expériences, nous voulons cependant montrer à quelles méthodes compliquées ont recours certains auteurs. Voici, par exemple, « le procédé simple préconisé par Lothar Dreyer pour cultiver conjointement et concurremment les bactéries aérobies et anaérobies¹ ».

1. Analysé par A. Marie dans *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1907, p. 5.

« On ensemence avec l'humeur à étudier de la gélose inclinée, dont ensuite on recouvre la moitié inférieure avec de l'agar liquéfié, en prenant soin de tenir verticale la surface ensemencée : sur la moitié supérieure de celle-ci se développent les microbes aérobies ; sur l'autre partie recouverte par la gélose pousseront les anaérobies, à la condition qu'il ne s'agisse pas d'anaérobies stricts », et d'ailleurs les microbes vont-ils supporter ce contact avec de la gélose versée chaude ?

Nous voulons par contre signaler le tube de Legros. Cet auteur a utilisé pour la culture des anaérobies des tubes ordinaires recouverts d'huile de vaseline, procédé élégant, mais insuffisamment rigoureux, encore qu'il puisse être utilisé pour les anaérobies peu exigeants.

4° Le tube d'Achalme (fig. 3). — Pour conserver une culture, soit que cette culture sporule et constitue une réserve de graine de microbe, soit que l'on veuille dans un but de démonstration, conserver un tube caractéristique, il faut utiliser le tube d'Achalme. En voici la préparation et le mode d'emploi.

Un tube ordinaire de lait, bouillon ou sérum liquide est ensemencé. Dans un premier temps on suture à la flamme, à la partie supérieure, une baguette de verre de 7 cm. de longueur environ. Dans un deuxième temps, en tenant le tube par le fond et par la baguette, on flambe circulairement à la soufflerie sa partie moyenne ; on l'étire légèrement, après l'avoir retiré de la flamme lorsque le verre se ramollit, de façon à produire un étranglement séparant la partie du tube contenant le milieu de culture de la partie supérieure. Cette portion amincie doit avoir 2 mm. environ de diamètre ; elle ne doit pas être flexible.

Dans un 3^e temps, en chauffant la partie supérieure du tube, on détermine un deuxième rétrécissement, au niveau duquel on brise le tube : il se présente alors de la manière suivante :

La partie inférieure ou fond du tube est surmontée d'une partie rétrécie, puis d'une partie plus large qui se continue à nouveau par un segment effilé. Il suffit alors dans un 4^e temps d'introduire l'effilure terminale dans le tube en caoutchouc de la trompe à eau, et de faire fonctionner la trompe. Lorsque le vide est fait, la fermeture au bec de Bunsen de l'effilure première fait obtenir une

culture en tube de verre clos, que l'on peut conserver indéfiniment.

Une modification préconisée par Achalme facilite la conservation de son tube après examen de la culture.

Un nouvel étranglement fait au-dessus du niveau du liquide permet de régénérer le tube qui est fermé à nouveau après production d'un étranglement à la flamme du bec Bunsen.

Le tube d'Achalme est devenu le point de départ de procédés moins rigoureux et simplifiés de culture des anaérobies en milieux liquides. Citons en particulier le procédé de Biffi (*Un método nuevo para el cultivo rapido de los microbios anaerobios estrictos*, *Bulletin de l'Académie de Médecine de Lima*, 1904, n° 2). L'auteur emploie des tubes de culture ordinaires qu'il fait bouillir et laisse refroidir avant l'ensemencement. Quand l'ensemencement est effectué, il fait une effilure à la partie supérieure du tube, fait bouillir à nouveau la partie haute du liquide, et ferme à la lampe pendant le dégagement de vapeur.

Ce procédé pour être simple ne paraît pas d'une technique rigoureuse, puisqu'il expose les germes ensemencés à être détruits par la chaleur propagée de la partie haute à la partie basse du liquide.

B. — TECHNIQUE SPÉCIALE DE L'AÉROBISATION DES ANAÉROBIES

I. La première manœuvre de l'aérobisation est la vérification de la fonction anaérobie par l'épreuve que nous avons dénommée la mensuration de l'anaérobiose; elle se pratique essentiellement de deux façons par la culture à des pressions graduées, et par la culture dans des tubes à diamètre variable contenant une colonne de liquide de hauteur plus ou moins grande.

1. *Mensuration de l'anaérobiose.* — 1° Par variation de la pression supportée par le liquide. — L'étuve à anaérobies de Roux serait applicable à cette recherche puisqu'il serait simple d'y graduer le vide; mais il faudrait avoir une série d'étuves, chose peu pratique, ou faire l'expérience en modifiant sans cesse la pression, ce qui allongerait indéfiniment la recherche, et immobiliserait cet

appareil. Il faut donc utiliser le tube d'Achalme. Voici notre dispositif (voir figure 4).

Une trompe à eau permet de faire le vide dans un tuyau métallique fermé à ses extrémités par deux robinets; un manomètre indicateur du vide est branché sur ce tuyau. Le tube métallique se continue par un tube de caoutchouc à parois épaisses, capable de résister à la pression atmosphérique. C'est à ce tube de caoutchouc que sera adapté le tube achalmisé où on fera le vide. Il est facile de comprendre que nous pourrions obtenir un vide plus ou moins grand de deux façons différentes, soit en modérant le débit de l'eau aspiratrice, soit en modérant l'aspiration par l'ouverture incomplète du robinet situé à l'origine de notre tube métallique. Les deux procédés sont également simples, pratiques et faciles à réaliser.

Voulons-nous obtenir une culture avec un vide de 76 centimètres, vide aussi complet que possible, anaérobiose relativement ¹ absolue? Nous procéderons ainsi : un tube ordinaire de cultureensemencé est traité comme pour en faire un tube d'Achalme, mais on s'arrête au 4^e temps, c'est-à-dire au moment de faire le vide. On ouvre au maximum le robinet de prise d'eau, auquel est adaptée la trompe à eau et on ferme le robinet sur lequel s'adapte le caoutchouc, c'est-à-dire le 2^e robinet du tube métallique. Après 5 minutes le manomètre monte à 75° ou 76°, il suffit alors d'adapter le tube préparé à l'extrémité du caoutchouc, puis d'établir la communication entre le tube et la trompe, par ouverture du 2^e robinet préalablement fermé. Pendant cette manœuvre, l'aiguille du manomètre a pu légèrement osciller ou descendre; elle est arrivée à 70 ou 68 par exemple. Rapidement elle revient à 75. Le tube sera pendant 5 à 10 minutes soumis à l'aspiration; le phénomène de l'ébullition dans le vide par dégagement des gaz dissous dans le milieu de culture sera constaté. Dans le cas présent, il sera permis de lécher légèrement le fond du tube avec la flamme d'un bec Bunsen, de façon à élever quelque peu la température du milieu et à favoriser l'extraction des gaz. Cette manœuvre introduirait une cause d'erreur dans les cultures faites à de simples raréfactions de pression. Après 5 à 10 minutes, le bec Bunsen placé sous le rétrécisse-

1. L'anaérobiose absolue a été réalisée par Chamberland grâce à une combinaison de flacons communicants, dont l'un contient une culture de subtilis. Une telle rigueur est absolument inutile, quel que soit d'ailleurs l'intérêt de la recherche biologique.

ment fermera le tube pendant que le vide continue à se maintenir.

Voulons-nous faire une culture avec une pression de 25 centimètres par exemple? La trompe à eau est mise en fonctionnement, robinet externe fermé. Mais dès que l'aiguille du manomètre marque un vide de 40 centimètres à 45 centimètres, chiffre légèrement inférieur au chiffre recherché, on diminue l'aspiration par la fermeture incomplète du robinet d'écoulement de l'eau, ou par celle du 1^{er} robinet de la canalisation. Il suffit alors d'adapter le tube préparé à la trompe et de manœuvrer le robinet de réglage pour laisser l'aiguille atteindre 50°. Après 10 minutes, on ferme au bec Bunsen comme il a été indiqué. Au cours de la manœuvre, fréquemment l'aiguille du manomètre reste immobile, c'est le cas le plus favorable. Si elle varie dans un sens ou dans un autre, il suffira de diminuer ou d'augmenter l'ouverture du robinet de réglage pour ramener l'aiguille au chiffre voulu. Il faut surtout se défier des ouvertures ou fermetures de robinets (prises d'eau ou ascenseur à eau, etc.) branchés sur la même canalisation et capables de produire de brusques modifications de débit. Le robinet de la trompe à eau dans une installation neuve sera, si possible, indépendant. Après leur préparation faite à la température moyenne du laboratoire, les tubes seront mis à l'étuve et laissés le temps nécessaire au développement des bactéries. Si par exemple tous les tubes fermés à un vide de 30 centimètres et plus ont poussé, on dira que le germe exige une anaérobiose de 30 centimètres, ou une pression de 46 centimètres, etc.

La question est souvent un peu plus complexe, car certains tubes donnent un développement du microbe, mais sans présenter les modifications spécifiques du milieu; ainsi une bactérie coagulant le lait, exigeant une anaérobiose de 40 centimètres par exemple, pourra se développer dans un vide de 30 à 35 centimètres sans altération du liquide. Ce sont là les cultures que nous avons dénommées histologiquement positives.

2° Le deuxième procédé de mensuration de l'anaérobiose est la culture des anaérobies en tubes profonds. Sous ce nom nous avons dénommé des tubes de culture ordinaires ayant le diamètre habituel des tubes à essai, c'est-à-dire 15 millimètres, mais présentant une longueur de 22 à 25 centimètres; ils peuvent contenir une colonne de

liquide ayant jusqu'à 18 et 20 centimètres de hauteur (fig. 5). Tous les anaérobies stricts ensemencés non parcimonieusement à la pipette se développent abondamment dans le tube profond, à partir d'une certaine hauteur constante pour chaque germe et pour chaque milieu, hauteur d'autant plus faible que le milieu plus compact a moins de tendance à se laisser pénétrer par l'air atmosphérique, et qu'il est plus favorable à la pullulation du germe étudié. Nous aurons à signaler plus loin l'importance du diamètre. Toutefois les spores exigent souvent pour germer d'être ensemencées en tube cacheté.

On rejettera dans ces expériences l'emploi du lait ordinaire, car le tube de lait passé à l'autoclave, se cache véritablement grâce au bouchon de crème qui le surmonte. Si on employait du lait de bonne qualité, on serait surpris de voir les anaérobies pousser dans les tubes contenant une hauteur de liquide de 3 à 4 centimètres. Malheureusement le fait n'est pas assez constant pour entrer dans la culture pratique des germes anaérobies. Il faudra utiliser un lait soigneusement écrémé. Nous donnons la préférence à certains laits écrémés par des procédés spéciaux que fournit le commerce, car l'écémage par ébullition préalable nous a paru insuffisant. Dans un mémoire intitulé : *Bacillus Putrificus* et *Bacilles anaérobies*, paru dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, 1905, Antoine Rodella a confirmé le fait en écrivant que les bactéries anaérobies « se développent très bien dans le lait entier stérilisé, la matière grasse faisant une couche superficielle épaisse, suffisant à mettre les anaérobies à l'abri de l'air ».

Il faudra se garder aussi d'employer des milieux fraîchement autoclavés, ils seraient également trop favorables. Le milieu ayant expurgé l'air dissous donne une culture faussement aérobie. Un milieu sera utilisable de 8 à 30 jours après sa sortie de l'autoclave. Par principe nous ne nous servons d'aucun milieu ayant plus de deux mois de préparation.

L'étude du **tube profond** par la constatation nouvelle de l'importance capitale de la hauteur des milieux liquides appela notre attention sur la valeur du diamètre des tubes employés; d'où la description du **tube étroit**, dont le type est un tube de culture ayant un demi-centimètre de diamètre (figure 5). La hauteur du liquide nécessaire aux cultures est fonction du diamètre des tubes. Si un tube moins large que le tube ordinaire donne

des cultures avec une hauteur moindre, un tube de 2 cm. $1/2$ de largeur nécessite une hauteur qui l'exclut de la bactériologie pratique. Nous n'avons pu établir aucune règle mathématique, aucun rapport précis entre la hauteur exigée et le diamètre des tubes.

Aucune particularité biologique différente des lois générales de l'aérobisation ne découle de l'étude du tube étroit. Quant au mécanisme du tube étroit, il résulte du moindre contact entre le liquide et l'air atmosphérique. Ainsi les tubes étranglés, les ballons étranglés se comportent comme des tubes étroits si le liquide arrive au niveau de l'étranglement. S'il arrive au-dessus ou au-dessous de l'étranglement, ils se comportent comme des tubes ayant uniformément le diamètre que présente le tube au niveau du liquide.

II. — De la technique générale de la mensuration de l'anaérobiose, résulte la technique de l'*aérobisation des anaérobies*, ou du moins les procédés essentiels de cette aérobisation.

1° Soit un microbe anaérobie qui s'est développé en tube d'Achalme à 30 centimètres de vide¹ dans un tube de 1 cm. $1/2$ de diamètre contenant une colonne de liquide de 5 centimètres. Une série de repiquages faite de 5 en 5 jours par exemple à des pressions de plus en plus fortes donnera des cultures exigeant un vide de moins en moins marqué; on arrivera ainsi par étapes à la culture pratiquée à la pression atmosphérique.

Dans cette aérobisation par gamme ascendante de pression, il faudra avoir soin de faire le réensemencement à la pipette, avec 7 à 10 gouttes de la culture primitive. Un réensemencement à l'öse ou à la pipette fermée introduirait trop peu de germes dans le nouveau tube de culture; un ensemencement trop riche serait une greffe. Lorsque l'aérobisation sera achevée, les repiquages se feront aisément par n'importe quel procédé.

Il est important de ne pas utiliser le tube ayant supporté la pression maxima; souvent les repiquages en sont négatifs même à une pression inférieure à la sienne. On prendra le tube de pression moyenne: par exemple soit un tube de culture anaérobie, dont la mensuration donne des cultures positives jusqu'à un vide de

1. C'est-à-dire avec une pression de 46 centimètres.

33 centimètres; utilisez pour la deuxième série le tube développé avec un vide de 33 centimètres. Les résultats en seront beaucoup plus sûrs.

2° Le procédé de la **gamme descendante de hauteur** utilise le tube profond. Si un microbe se développe abondamment dans les tubes de lait ayant 1 cm. 1/2 de diamètre et au minimum 12 centimètres de hauteur, les repiquages seront faits pour la raison exposée précédemment avec un tube de 1 cm. 1/2 de diamètre et 15 centimètres de hauteur. On pourra procéder par nouvelles mensurations : dans ces cas l'ensemencement à la pipette d'une nouvelle série de tubes de lait ayant de 8 à 15 centimètres de hauteur, fixera par exemple un nouveau minimum de 10 centimètres et une hauteur moyenne de 12 centimètres. Avec le tube de 12 centimètres bien développé, nouvelle mensuration qui abaisse encore la valeur de la colonne indispensable et ainsi de suite jusqu'à la culture sur lait de 1 cm. 1/2 et 3 centimètres de hauteur. Il sera plus méthodique et plus sûr de faire les cultures en série dans des tubes dont la colonne de liquide décroîtra de centimètre en centimètre; les repiquages seront faits de 4 en 4 jours, pour laisser à la culture le temps de se développer amplement; la pipette prélèvera 7 à 10 gouttes de la partie supérieure de la culture mère, et les ensemencera dans la profondeur du nouveau tube¹.

La gamme descendante peut s'effectuer également avec le bouillon, l'eau peptonée, l'eau peptonée-gélatine-glucose. D'une façon générale, il est difficile d'arriver aux tubes bas avec les séries initiales de ces milieux; en tout cas, une série descendante en bouillon simple ou en bouillon Martin permet difficilement l'obtention de cultures sur gélose inclinée si elle est *initiale*, c'est-à-dire née du repiquage d'un tube anaérobie dans ces bouillons. Ces cultures sur milieux solides s'obtiennent assez souvent avec les tubes bas de lait; sinon, après avoir effectué la série descendante en lait, il faut recommencer soit sur mélange à parties égales de bouillon et de lait, soit sur lait coupé à moitié ou au tiers d'eau, et terminer par une nouvelle série sur bouillon. Ce procédé de

1. Il arrive que les bacilles dans le tube profond ne soient nombreux que dans la partie inférieure du tube. Dans ce cas, il faudra faire sa prise dans la partie riche de la culture.

gammes descendantes répétées donne toujours des repiquages positifs sur gélose inclinée.

3° D'autres techniques peuvent être employées. Le procédé par délanolisation du tube cacheté est fort simple. Soit un tube cacheté, où s'est développé largement un anaérobie; on fond au bec Bunsen la bague de lanoline que l'on aspire avec une pipette un peu large. La culture est ainsi devenue une *culture pseudo-aérobie*; il suffira de la laisser vieillir; des prises faites dans les zones supérieures du tube après quelques semaines si la culture a une vitalité suffisante, donneront par réensemencement des cultures vraiment aérobies.

4° De même la culture en culot de gélatine (tube de Liborius) peut être utilisée pour les anaérobies liquéfiant de ce milieu. Elle le sera de la façon suivante :

a. D'abord par simple vieillissement : soit un tube de Liborius rempli de gélatine, ensemencé avec un germe anaérobie liquéfiant et gardé à la température de la chambre; le développement de la culture amène la liquéfaction des parties profondes; il subsiste une bague supérieure non liquéfiée de gélatine.

Plus tard cette bague sera digérée à son tour; d'ailleurs, il suffirait de porter le tube dans l'étuve à 37° pour en produire la fonte. Ainsi sera obtenue une culture pseudo-aérobie du germe étudié.

La mensuration de l'anaérobiose de cette culture pseudo-aérobie donne au moment où elle vient d'être obtenue des chiffres identiques à ceux que donnerait la mensuration faite avec une culture anaérobie ordinaire. Mais il n'en est plus de même après quelques jours, encore moins si la culture est bien vivace, après quelques semaines. Car une culture pseudo-aérobie après 7 semaines peut donner des cultures abondantes sur tous milieux aérobies.

b. Si le simple vieillissement de la culture est insuffisant, on aura recours à la culture en série sur gélatine en tubes de Liborius. Trois ou quatre générations sont suffisantes pour amener l'aérobisation, à condition que les repiquages soient faits au moment où les cultures encore vivaces ont abondamment pullulé dans les tubes. Des repiquages de 15 en 15 jours faits à la pipette, avec prise dans les parties supérieures et ensemencements dans la profondeur, donnent de bons résultats.

III. — *La méthode aérobie de culture des anaérobies de Tarozzi; résumé analytique et critique.* — A l'étranger, Tarozzi a montré que certains microbes anaérobies pouvaient cultiver en présence de l'air libre dans des tubes de bouillon, où plongent des morceaux de tissus frais de lapin, de cobaye ou de souris blanche.

Il a exposé ses recherches dans un mémoire original du *Centralblatt für Bacteriologie*, 45 avril 1905 (t. XXXVIII, p. 619-623); une bonne analyse en a été publiée par Besredka dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1905 (p. 505).

D'après Tarozzi, l'oxygène agit sur les anaérobies non d'une façon directe mais en entravant l'utilisation des substances alimentaires contenues dans les milieux ordinaires. Mais l'oxygène ne saurait empêcher l'anaérobie d'utiliser les substances contenues dans des morceaux frais récemment excisés de viscères d'animaux. Naturellement, avant l'ensemencement, un séjour de 48 heures à l'étuve à 37° vérifie l'asepsie du milieu et fait rejeter les tubes contaminés. Il est permis de faire bouillir les tubes pendant quelques minutes; mais après 5 minutes d'ébullition, les tubes sont inutilisables. Le passage à l'autoclave avec stérilisation à 105° donne des tubes qui ne se prêtent à la culture des anaérobies que pendant une dizaine de jours. Fait bien particulier, il faut absolument ajouter au milieu de culture des morceaux d'organe. Le sang, le sérum ou le lait ne sauraient les remplacer. Quelle est cette substance si curieuse, qui modifie à ce point la biologie des anaérobies, l'auteur ne le dit pas.

Ne devons-nous pas rapprocher ce phénomène de la nécessité des aliments frais pour les animaux supérieurs, de la pathogénie du scorbut et de la maladie de Barlow?

Le *Bulletin de l'Institut Pasteur* de 1906 publie l'analyse de deux travaux qui confirment l'efficacité de la méthode de Tarozzi.

Adam Wrzosek (*Przegled lekarsky* n° 45, 1905, pp. 701-703), a cultivé par ce procédé le bacille du tétanos, le bacille de l'œdème malin, le bacille de la gangrène gazeuse et le bacillus botulinus. Les bacilles, dit-il, poussaient abondamment, même lorsque les tissus frais étaient éloignés du bouillon avant l'ensemencement des microbes, et lorsque le bouillon était fortement aéré. Le même

1. Voir *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1906.

auteur dans le même périodique précise (1906, n^{os} 40, 43) les conditions d'application de la méthode de Tarozi. Il s'efforce dans les cultures de remplacer les morceaux de tissu animal par des fragments de végétaux, particulièrement par des morceaux de pomme de terre. Il utilise aussi les morceaux de jaune ou de blanc d'œuf cuits, et les tissus d'animaux putréfiés.

Le vibrion septique, le *B. botulinus* et le *B. Chauvoei* cultivent largement dans ces milieux, même stérilisés à l'autoclave pendant 25 minutes.

Pour 10 cc. de bouillon, il faut mettre environ 1 cc. de pomme de terre. L'auteur obtient des cultures même dans l'eau distillée où il introduit les tissus précédemment énoncés.

« De ses recherches, l'auteur conclut au passage, dans les milieux de culture, de certaines substances provenant des tissus introduits, substances qui non seulement favorisent le développement des anaérobies stricts, mais leur fournissent tout le matériel nécessaire à leur existence. Ces substances résistent à la chaleur, mais sont détruites par l'action prolongée de l'air atmosphérique et de la lumière solaire. »

Le procédé de Tarozi est donc un procédé élégant de culture des microbes anaérobies en présence de l'air, grâce à des substances favorisantes; il y aurait là sans doute par diminution progressive de ces substances ou par vieillissement une technique nouvelle d'aérobisation. Aussi, nous avons fait à ces travaux postérieurs aux nôtres une place tout à fait spéciale. Mais l'idée directrice est entièrement différente de la nôtre.

DEUXIÈME PARTIE

RELATION DES EXPÉRIENCES FAITES AVEC DIFFÉRENTS GERMES ANAÉROBIES

A. — CHOIX DES MICROBES; VÉRIFICATION DE PURETÉ ET CONTROLE DES CULTURES

Pour établir d'une manière indiscutable les faits nouveaux annoncés, il était important de faire un choix judicieux des germes anaérobies soumis à l'expérience. Certains d'entre eux comme le *bacillus ramosus* jouent un rôle important dans la pathologie humaine, en particulier dans la gangrène pulmonaire (Guillemot); malheureusement leur étude biologique, trop récente encore et insuffisamment documentée au point de vue de la recherche des fermentations, n'aboutit pas à des constatations biologiques ou expérimentales d'une netteté suffisante pour que soit écartée l'hypothèse toujours troublante d'une contamination des tubes au cours des expériences : nous rappelons en effet toute la valeur des fermentations d'hydrate de carbone dans le déterminisme microbien. Nous nous sommes donc contenté au moins à titre provisoire d'une vérification générale de nos expériences pour le *bacillus ramosus*, le *staphylococcus parvulus*, le *bacillus bifidus*, dont l'étude présente cependant un grand intérêt. Nous avons peu insisté sur certains microbes comme le bacille gracile éthyllogène dont nous avons donné avec Achalme la première description. Notre effort essentiel a porté sur des anaérobies à la fois hautement différenciées, et fréquemment étudiées. Le bacille d'Achalme ou *bacillus perfringens*, le vibrion septique dont l'étude remonte à

Pasteur même, le bacille du tétanos ont été suivis avec soin dans les différentes phases de leur aérobisation.

L'origine de nos cultures est double :

Pour le vibron septique et le bacille du tétanos, nous avons utilisé des cultures initiales fournies avec beaucoup d'amabilité par la collection de l'Institut Pasteur et par notre collègue et ami Martin, médecin de l'hôpital Pasteur. Pour le bacille d'Achalme, le vibron septique et le bacille du tétanos, nous avons utilisé, en outre, des cultures mères sporulées données par Achalme que nous sommes heureux de remercier ici. Ces cultures provenaient de ses recherches sur le groupe tryptobutyrique des bactéries anaérobies, qu'il a décrit dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, sept. 1902.

Quelle que soit leur origine nos cultures initiales ont toujours été soumises à un contrôle de pureté et d'identité.

a. Tout d'abord les repiquages abondants faits à la pipette sur gélose inclinée sont négatifs. Ces tubes de gélose sont conservés longtemps au laboratoire pour éliminer l'hypothèse d'une contamination d'une bactérie à développement tardif. Les repiquages sur gélose sucrée éliminaient l'hypothèse de l'introduction d'une levure.

b. D'autre part les cultures sont ensemencées en tube Liborius de gélose. Les colonies isolées développées de ce milieu sont vérifiées tant au point de vue de leur aspect extérieur qu'à celui de leur nature (examen au microscope avec ou sans coloration). Pour le bacille du tétanos, une de nos races *Tm* est née d'une culture en série de 8 tubes de Liborius repiqués de 3 en 3 jours avec une colonie isolée du tube précédent.

c. Enfin le contrôle d'identité était établi en vérifiant la morphologie, les fermentations, et le caractère pathogène tel qu'il est décrit dans les traités classiques.

Tous nos tubes étaient étiquetés de la façon suivante. Ils portaient une lettre, en général la première du nom du microbe, A pour le bacille d'Achalme, V pour le vibron septique, quelquefois une double lettre pour indiquer la race ou l'origine; ainsi *Tm* veut dire tétanos dû à l'amabilité du Dr Martin. Après la lettre nous mettons soit un numéro d'ordre, soit plutôt le jour et le mois en chiffre, suivi d'un 3^e chiffre indiquant quel rang occupe ce tube dans les cultures faites au jour indiqué. Ainsi $V_{23.5.17}$ indique qu'il

s'agit de vibrion septique, que l'ensemencement a été fait le 23 mai, et que le tube est le 17^e repiquage de ce germe fait ce jour-là.

Cette notation était reportée sur de grands tableaux synoptiques, qui donnent la filiation de nos cultures; si bien qu'en reprenant un tube de novembre 1906, par exemple, nous pouvons indiquer sa complète généalogie depuis le début de nos recherches.

Sur le tableau synoptique, nous marquons la nature du tube, puis les résultats de son examen, et les caractères relevés sur les lamelles.

Une telle technique est longue et fatigante, mais elle est sûre; elle ne permet pas de substituer à la vérité une conception fantaisiste; c'est pourquoi nous l'avons suivie.

B. — LE BACILLE D'ACHALME OU *BACILLUS PERFRINGENS*

Nous allons résumer les caractères classiques du bacille d'Achalme ou *bacillus perfringens* tels qu'ils résultent des travaux de Veillon et de ses élèves d'une part, et des recherches d'Achalme d'autre part. Nous rappelons que ce bacille fut découvert en 1891 par Achalme dans les lésions cardiaques d'un malade mort de rhumatisme articulaire aigu.

I. — Gros bâtonnet de la taille de la bactéridie charbonneuse à extrémités nettement limitées et carrées, s'entourant dans le pus et dans le corps des animaux d'une auréole ou même d'une capsule légèrement colorable. Le plus souvent les éléments sont isolés, parfois bout à bout en chaînette de bacilles. La longueur varie, elle est courte dans les milieux riches en hydrates de carbone, longue dans les milieux organiques. Le bacille perd sa capsule dans les cultures, se colore aisément par le Gram et le Claudius; mobile, il se déplace lentement sous le champ du microscope et n'a pas la vivacité du bacille d'Eberth ou du *bactérium coli* commune.

La culture en est facile, abondante; elle se fait aussi bien à la température du laboratoire qu'à l'étuve à 37°.

En gélose profonde glucosée à 37° la culture peut débiter après quelques heures. Bientôt la fermentation du glucose dégage une

odeur rance; après 24 heures, le tube est retrouvé débouché par l'expansion des gaz dégagés, contenant une colonne de gélose en miettes, d'où la recommandation faite par Achalme de ne pas cultiver son bacille en gélose glucosée mais en gélose mannitée, à cause de la non-fermentation de la mannite par ce microbe.

Un ensemencement pauvre fait développer dans la gélose des colonies qui apparaissent sous la forme de grands disques lenticulaires minces, réguliers, blanchâtres (Guillemot). « Sur la surface de la gélose anaérobie, les colonies forment de petits points blancs humides analogues aux colonies de streptocoques, mais moins opaques, bleutés par transparence. A un faible grossissement, les colonies sont jaunâtres, granuleuses, transparentes, à bords fins, réguliers, ou ondulés très flous. » Achalme, de même, note la production sur gélose inclinée anaérobie d'une couche à peine sensible.

Le bouillon ou la gélatine mis à l'étuve sont troublés abondamment et rapidement. Il se forme au fond du tube un dépôt d'apparition plus ou moins rapide d'après la richesse de la culture; à ce moment le bouillon s'éclaircit, mais incomplètement. La gélatine est liquéfiée tout en conservant sa limpidité et souvent sans donner de dépôt appréciable.

Les milieux organiques sanglants, eau peptonée ou sang hémoplasme donnent lieu à des cultures très abondantes. D'après Achalme, le sérum liquide ne serait pas favorable à cause des propriétés antitryptiques du sérum.

En eau blanc d'œuf cacheté, culture abondante et rapide, très belle déjà après 24 heures. Les arêtes du cube de blanc d'œuf s'arrondissent, puis le cube devient transparent et disparaît, digéré par la trypsine sécrétée par le germe; en même temps se développe un pigment noir décrit par Achalme. La membrane d'enveloppe de l'œuf n'est pas digérée.

En lait cacheté, milieu de choix (Achalme) on observe un double phénomène. Si le lait cacheté a été additionné de carbonate de chaux, malgré la fermentation de la lactose le milieu reste alcalin; la trypsine agit et le lait est coagulé avec digestion consécutive de la caséine, d'où exsudation d'une grande quantité de sérum transparent ou légèrement trouble et formation d'un caillot assez peu considérable.

Si le milieu devient acide, la trypsine ne saurait aussi complète-

ment agir; le lait est simplement coagulé, la digestion de la caséine est entravée.

Le lait en 24 heures est donc transformé en un liquide absolument transparent, contenant un caillot blanc aréolaire très rétracté, plus ou moins considérable, qui occupe le fond du tube ou adhère à la paroi.

La sporulation se produit dans les cultures en milieux alcalins, surtout en eau blanc d'œuf. Cette condition *sine qua non* établie par Achalme explique la prétendue absence de sporulation signalée par Veillon et ses élèves.

Achalme a étudié attentivement la fermentation des hydrates de carbone produite par son bacille. Par un procédé élégant, il a montré que cette fermentation acidifiait le milieu, et entravait la digestion tryptique du blanc d'œuf; par conséquent on peut opposer un tube eau blanc d'œuf simple où l'albumine est dissoute, à un tube où l'albumine reste intacte par fermentation acidifiante d'un hydrate de carbone dissous dans le liquide. En utilisant la méthode de Duclaux, il a montré qu'une production régulière d'acide acétique et d'acide butyrique accompagnait la fermentation des hydrates de carbone suivants (voir *Institut Pasteur*, t. XVI, p. 659) : maltose, glucose, galactose, lactose, saccharose, inosite, glycérine, dextrine, amidon. Au contraire, le bacille d'Achalme ne fait pas fermenter les produits suivants : mannite, dulcité, inuline, érythrite, amygdaline. Ces fermentations sont spécifiques, c'est-à-dire caractéristiques des espèces (Grimbert, Achalme, etc.). Le bacille d'Achalme réduit les nitrates et ne forme pas d'indol.

C'est également à Achalme que l'on doit l'étude du pouvoir tryptique de ce microbe (*Annales de l'Institut Pasteur*, 97 : La bactériologie du rhumatisme articulaire aigu).

Inoculé au cobaye, sous la peau de l'aîne, ce microbe tryptobutyrique produit soit un œdème infiltré et gélatiniforme riche en bactéries, soit un phlegmon gazeux avec décollement des muscles et du tissu cellulaire sous-cutané, d'autres fois une vaste poche séreuse avec nécrose ou infiltration hémorragique des fibres musculaires voisines. La sérosité elle-même prend souvent la teinte sanglante.

Le cobaye succombe en 48 heures à l'inoculation.

Injecté au lapin, le bacille d'Achalme produit localement un œdème séreux avec pullulation locale du bacille et développement

irrégulier de gaz. L'inoculation intraveineuse de fortes doses de culture donne au lapin une septicémie mortelle en une semaine environ; à l'autopsie on remarque la congestion très marquée des viscères.

Par une technique spéciale, Thiroloix a reproduit avec le bacille d'Achalme, extrait des cultures du sang des rhumatisants pendant la vie, les différentes lésions viscérales du rhumatisme articulaire aigu.

Les divergences de Veillon et d'Achalme sur ce bacille tiennent à la différence des techniques employées; leurs travaux fort beaux se complètent mutuellement.

II. — Le bacille d'Achalme par sa haute différenciation chimique et biologique, par son rôle considérable dans la pathologie humaine, rhumatisme articulaire aigu [Achalme, Thiroloix, Triboulet, Carrière, etc. ¹], appendicite, otites graves [Veillon, Zuber, Guillemot, Rist, etc.], méritait d'attirer notre attention. De plus sa pullulation facile, sa vitalité considérable dans nos tubes cachetés, sa sporulation le désignaient comme microbe d'études.

*
* *

1° Nous avons tout d'abord étudié la mensuration de l'anaérobiose de ce bacille.

a. MENSURATION DE L'ANAÉROBIOSE PAR ÉCHELLE ASCENDANTE DE PRESSION.

— Si onensemence à la pipette avec une culture bien développée en bouillon ou en lait cacheté des tubes de lait ou de bouillon contenant une colonne liquide de 5 à 6 centimètres, d'un centimètre et demi de diamètre; si dans un deuxième temps on les transforme en tubes d'Achalme avec les précautions indiquées au chapitre général de technique en ayant soin de les fermer à la lampe avec un vide de 10, 20, 30, etc., et 75 centimètres marqués au manomètre, on obtient les résultats suivants :

Tous les tubes dans lesquels la pression de l'air était au plus de 30 centimètres donnent en 24 heures une culture abondante. Tous les tubes à pression variant entre 30 et 45 centimètres poussent en 72 heures à 86 heures, et leur culture est d'autant

1. Voir *Société Médicale des Hôpitaux* (16 et 23 juillet 1907), les communications de Thiroloix et Georges Rosenthal.

plus intense que la pression y est plus faible. Tous les tubes où la pression dépassait 45 centimètres restent stériles, le bouillon clair, le lait intact. Il est évident, malgré l'exactitude de ces faits, qu'il faut admettre une certaine élasticité dans les résultats. Tous nos tubes sont ensemencés avec 7 à 10 gouttes de culture, des ensemencements plus abondants risqueraient de fausser les résultats; des ensemencements pauvres au fil de platine par exemple pourraient ne pas permettre l'accoutumance des bactéries à la vie anaérobie atténuée.

b. MENSURATION DE L'ANAÉROBIOSE PAR CULTURE EN ÉCHELLE DE TUBES PROFONDS. — Si on ensemence à la pipette avec 7 à 10 gouttes de culture bien développée, des tubes profonds de lait très crémeux, tous les tubes, quel que soit leur diamètre, quelle que soit la hauteur de colonne de liquide, donnent en 24 heures une culture abondante avec liquéfaction de lait digéré, ce sont en somme de vraies cultures en tube cacheté.

Les résultats suivants ont été obtenus avec des laits écrémés du commerce. Après 24 heures, tous les tubes de 1 cm. $\frac{1}{2}$ de diamètre ayant une colonne de liquide de hauteur supérieure ou égale à 12 centimètres ont abondamment proliféré. Les tubes dont la hauteur de lait varie de 12 à 9 cm. $\frac{1}{2}$ se montrent successivement positifs dans un délai de 3 jours. Au-dessous de 9 centimètres, les tubes restent stériles, même avec un ensemencement considérable. Toutefois certains tubes de 9 centimètres et de 8 cm. $\frac{1}{2}$ donnent dans un délai variable un développement de germes sans modification chimique du milieu. Ces cultures histologiques si différentes de la culture initiale méritent d'appeler l'attention, elles ont une grosse importance biologique.

Sur lait non crémeux coupé à moitié d'eau peptonée, les résultats presque identiques sont un peu moins favorables.

Sur bouillon et eau peptonée, les tubes profonds ayant une colonne de liquide supérieure à 15 centimètres poussent en 24 heures. De 12 à 15 centimètres, on obtient des cultures abondantes en 2 à 3 jours. Au-dessous de 12 centimètres, aucun développement.

En eau blanc d'œuf, c'est-à-dire dans des tubes contenant des cubes de blanc d'œuf plongés dans de l'eau, la culture se fait abondamment et la sporulation s'accomplit si la hauteur du liquide

est supérieure à 15 centimètres. De 11 à 15 centimètres les résultats sont positifs, mais il peut se produire quelque échec. Les tubes de 9 centimètres et au-dessous restent stériles.

L'eau additionnée de fibrine en poudre donne des résultats inconstants. Souvent la fibrine forme au fond du tube un magma imperméable. L'ensemencement de ce magma n'est plus ni aérobie, ni anaérobie. Mieux vaut n'en pas tenir compte.

2° La mensuration de l'anaérobiose nous conduisait à l'adaptation progressive à la vie aérobie. Nous y avons été conduit par différentes voies.

a) ADAPTATION A LA VIE AÉROBIE PAR ÉCHELLE ASCENDANTE DE PRESSION.

— Si on reprend les tubes de bouillon et de lait ayant servi à la mensuration de l'anaérobiose, on peut après quelques jours mesurer à nouveau l'anaérobiose du tube limite ayant supporté une pression de 45 centimètres. On obtiendra ainsi une culture de bacille d'Achalme supportant une pression de 50 centimètres. De mensuration en mensuration, on arrivera à obtenir une culture en bouillon aérobie de 6 centimètres de hauteur à la pression atmosphérique. Souvent les repiquages sur gélose inclinée resteront négatifs. Au chapitre général de technique, nous avons déjà dit que nous repoussions l'emploi du tube de pression maxima. Avec le bacille d'Achalme, qui supporte d'emblée une pression de 45 centimètres, il est préférable d'utiliser pour continuer la série d'aérobisation un tube fermé à une pression de 20 à 25 centimètres.

b) ADAPTATION A LA VIE AÉROBIE PAR ÉCHELLE DESCENDANTE DE TUBES PROFONDS. — Le lait écrémé donne les meilleurs résultats. En partant d'une culture de 12 centimètres de hauteur, car il est également indiqué de ne pas utiliser le tube de hauteur minima, on obtient facilement par des repiquages faits de 3 en 3 jours des cultures abondantes sur lait de 10, 9, 8, 7, etc., 2 centimètres de hauteur.

Sur eau peptonée, la culture en échelle descendante est difficile; elle échoue souvent si la culture initiale sur eau peptonée a été obtenue par repiquage d'une culture anaérobie; elle est possible si la culture sur eau peptonée glucose de 14 centimètres a été le repiquage d'une culture aérobisée sur lait de 2 centimètres. On peut alors, par des réensemencements assez larges, faits de préférence de 3 en 3 jours avec les parties superficielles de la culture

mère dans la partie profonde du nouveau tube, arriver au tube de culture ordinaire, tube d'eau peptonée de 1 cm. 1/2 de diamètre et de 3 à 4 centimètres de hauteur.

La culture en gélose inclinée s'obtient toujours difficileusement. Sur gélose sérum, ou sur gélose hémoplasme par notre procédé¹, les résultats sont un peu plus favorables; on obtient ainsi des cultures étalées, blanchâtres, opalines ou opaques, peu saillantes, à bords irréguliers se fondant progressivement avec le milieu de culture, ayant de 1 à 3 millimètres environ de diamètre. Lorsque la gélose se dessèche, la colonie prend un aspect légèrement rugueux.

La vitalité de ces cultures sur gélose inclinée est des plus précaires. Souvent tous les repiquages échouent; en général, il est difficile d'obtenir en série des cultures sur gélose inclinée: une nouvelle culture sur gélose ne s'obtient qu'après avoir rendu au bacille un peu de vitalité par un passage en lait écrémé de 6 à 10 centimètres de hauteur (voir fig. 6).

*
* *

Dans cette série de passages où s'est effectuée l'aérobisation du bacille d'Achalme, ce germe n'a rien perdu de ses propriétés.

Morphologiquement, il est resté ce gros bâtonnet trapu ayant presque les dimensions de la bactériodie charbonneuse, à extrémités carrées. Quelquefois, lorsque le repiquage est hâtif, on trouve dans la nouvelle culture, mêlées aux formes habituelles, des formes courtes, des bacilles moniliformes, ou des bacilles allongés et fins, qui disparaissent après quelques jours. Ce sont probablement des formes d'involution, des éléments qui ont été incapables de s'adapter aux nouvelles conditions d'existence. Quelquefois les lamelles faites avec les parties superficielles de la culture sont pauvres en bactéries; elles forment alors un dépôt abondant au fond du tube. Sur gélose inclinée, les colonies comprennent une majorité de formes normales trapues, saines, prenant le Gram et le Claudius, mêlées à un nombre assez considérable de formes irrégulières, massuées, moniliformes, à des bacilles minces et ténus, des filaments allongés, à des éléments se colorant mal ou incapables

1. L'hémoplasme, milieu sanglant en bactériologie. Soc. Biologie, 23 juin 1906.

de résister à la décoloration par l'alcool après mordantage à l'eau iodo-iodurée : toutes variations de formes que l'on retrouve dans les vieilles cultures anaérobies.

Mais le fait important et capital de l'aérobisation est la conservation absolue de toutes les fonctions fermentatives, pathogènes, biologiques du germe.

Conservation absolue des propriétés fermentatives, car le cube de blanc d'œuf est digéré par la trypsine du germe aérobisé, la gélatine est liquéfiée, car l'amidon est saccharifié, la lactose est digérée avec un dégagement d'acide acétique et butyrique dont l'odeur n'est que trop facile à reconnaître. Conservation des fonctions pathogènes, car la culture jeune sur gélose émulsionnée dans du bouillon et inoculée au pli de l'aîne du cobaye le tuera de toxhémie avec phlegmon gazeux et infiltration hémorragique au point inoculé (toutefois il y a rapidement une légère atténuation); les modifications morphologiques sont transitoires et légères; la culture en eau blanc d'œuf aérobie nous donnera une sporulation aérobie, comme la culture en eau blanc d'œuf cacheté nous donnait une sporulation anaérobie. Nous précisons plus loin les conséquences de cette sporulation aérobie.

Achalme, comme nous l'avons dit, a signalé dans ces cultures en eau blanc d'œuf anaérobie la formation en quantité variable et jamais très abondante d'un pigment noir, insoluble dans l'eau, l'alcool et les alcalis concentrés, soluble dans l'acide sulfurique, qui présente de grandes analogies avec la mélanine. Ce pigment se retrouve dans les cultures sur fibrine et en solution concentrée de peptone. Sa formation est commune aux microbes du groupe trypto-butyrique. Les cultures aérobisées du bacille d'Achalme fabriquent ce pigment qui est identique en quantité, propriétés physiques et chimiques au pigment original.

*
* *

Mais cette conservation des fonctions fermentatives et pathogènes n'est que provisoire. Elle présente un intérêt biologique général; nous aurons dans la troisième partie de ce travail à y revenir. Si on continue à cultiver le bacille d'Achalme soit en série de gélose inclinée (en alternant, ce qui nous a paru indis-

pensable, la culture en gélose inclinée et la culture sur lait de 1 cm. 1/2 diam. et de 5 cm. haut), soit même en tubes bas de lait ou bouillon, la biologie du germe se modifie rapidement; c'est la deuxième étape de l'aérobisation, étape de la discordance aéro-anaérobie. En culture aérobie le blanc d'œuf résiste aux sécrétions microbiennes; d'abord la digestion malgré la pullulation du germe en est tardive, plus tard elle reste incomplète, puis le cube de blanc d'œuf a simplement ses arêtes vives arrondies; enfin il reste intact. De même pour le lait, on voit de repiquage en repiquage succéder à la digestion rapide une digestion retardée, une coagulation et digestion incomplète, puis à peine ébauchée, une coagulation sans digestion, ou une liquéfaction tardive sans coagulation. La gélatine (nous y reviendrons plus loin au lieu d'être liquéfiée est transformée en une gelée visqueuse par un début de digestion. Le pouvoir pathogène s'atténue également. Au début le cobaye inoculé mourra de cachexie toxique avec un phlegmon gazeux à peine marqué; puis il résistera à l'infection, fera au point inoculé un simple abcès avec pus louable, épais et concret, riche en polynucléaires, indiquant la réaction favorable de l'organisme et la variation de la chimiotaxie devenue positive: enfin un simple amaigrissement consécutif à l'inoculation disparaîtra spontanément en quelques jours. Cependant ce bacille qui paraît si différent de son origine revient rapidement à son type primitif si on le cultive à nouveau en anaérobiose. Dès la première culture cachetée, plus tard à la seconde ou à la troisième faite en série le bacille d'Achalme redevient trypto-butyrique et gangrénigène, il a récupéré ses propriétés initiales sans exception. Nous appelons anaérobie de reconstitution les cultures anaérobies obtenues à ce moment précis par repiquage de cultures aérobies ayant perdu leur différenciation. Cette double orientation des repiquages aérobie et anaérobie d'une même culture montre assez quelle est la puissance considérable de l'adaptation au milieu. Elle n'est d'ailleurs possible que pendant cette période, pendant cette deuxième étape de l'aérobisation.

Si avec beaucoup de précautions, la culture en série du germe se prolonge, elle atteindra le 3^e stade, caractérisé par la perte absolue des fonctions fermentatives et pathogènes. Même en culture anaérobie la culture sur lait donne un pullulement considérable, sans qu'il s'y produise ni coagulation, ni liquéfaction. Le blanc

d'œuf est intact, la gélatine sous les réserves faites plus loin n'est pas liquéfiée, le cobaye inoculé maigrit à peine, et supporte des doses de 3 à 4 centimètres de culture. C'est à peine si par exception une inoculation massive peut le tuer avec un phlegmon gazeux, plus souvent avec un abcès local où se régénérera le bacille.

Le bacille perfringens privé de toutes fonctions est devenu le bacillo-gène perfringens, bactérie légèrement mobile, sans fonction. Nous aurons à discuter plus tard les rapports du bacille et de son bacillo-gène.

Il nous reste à indiquer la valeur de la sporulation aérobie et celle de l'anaérobie de reconstitution.

L'anaérobie de reconstitution fait retour au type anaérobie. En se régénérant, en reprenant sa force pathogène, son chimisme, il perd d'une façon complète son adaptation à la vie aérienne. Quelques précautions sont nécessaires dans la conduite des expériences; leur méconnaissance amènerait à des erreurs évitables ceux qui voudraient répéter nos recherches sur ce point : il faut éviter de repiquer dans un délai de temps trop court la culture anaérobie de reconstitution; car dans les premiers jours, la culture peut avoir conservé des éléments de la culture aéro-bisée mère; un repiquage positif n'aurait donc aucune valeur. De même, il faut autant que possible éviter de partir d'une culture aéro-bisée sporulante, de peur que ces spores ne deviennent une cause d'erreur, comme nous le verrons plus loin en indiquant la valeur de la sporulation aérobie. Nous avons pris soin d'utiliser une culture anaérobie de reconstitution en eau blanc d'œuf cacheté, donc sporulante, née du repiquage d'une culture asporogène sur gélose inclinée. Nous avons fait des expériences à longue échéance, 3 mois, 6 mois et 1 an.

Voici maintenant un exemple type :

Le tube $A_{917.3}$ est un tube eau œuf anaérobie de reconstitution né le 13 mai 1906 du repiquage anaérobie d'un tube de gélose inclinée A_{917} du 11 mai 1906. Les repiquages aéro-bies de ce dernier tube ont donné des cultures maigres peu vivaces, sans action chimique. En 3 jours, au contraire, la culture de $A_{917.3}$ était superbe et bientôt les cubes de blanc d'œuf étaient digérés.

Le 30 avril 1907, cette culture est repiquée sur les tubes A_9 gélose inclinée, A_{10} lait aérobie de 1 1/2 diamètre 8 hauteur; A_{11} eau œuf

aérobie de 1 1/2 diamètre et 5 1/2 hauteur. Tous ces tubes restent stériles. Par contre les tubes cachetés de repiquage donnent d'abondantes cultures. Le 5 mai, un tube cacheté en plein développement est repiqué sur laits aérobie en gamme de hauteur; seuls les laits de 1 c. 1/2 diamètre 9 c. hauteur ont permis la pullulation du germe. L'anaérobie de reconstitution a donc la même mensuration que l'anaérobie initiale. La sporulation aérobie, par contre, peut donner naissance à des races nouvelles: mais les résultats ne sont pas constants; parfois ils sont négatifs, parfois même les cultures nouvelles ne donnent pas de repiquage de deuxième génération; le plus souvent est créée une race nouvelle, ayant les propriétés du bacille anaérobie, mais supportant le contact de l'air; nous disons alors que le bacille d'Achalme est devenu l'aérobacille d'Achalme. Nous allons donner trois exemples d'études de sporulation aérobie; l'un d'échec complet, l'autre d'obtention de culture de faible vitalité à repiquages négatifs, le troisième de création de race incomplètement aérobisée puisque les cultures sur gélose inclinée ont échoué.

Le tube A₉₃₇ du 12 mai 1906 est un tube eau œuf 1 c. 1/2 diamètre 9 c. hauteur bien digéré. Le 23 mai 1906, un ensemencement sur gélose inclinée est négatif. Le 26 avril 1907, ce tube est repiqué avec succès sur lait cacheté et sur laits profonds 1 1/2-18 et à 1/2-12. Un tube de lait A₄ de 1 1/2 8 1/2 donne lieu à un développement tardif. Tous les repiquages en lait bas, bouillon gélatine bas échouent. De plus, le lait cacheté est repiqué sans succès le 5 mai 1907 sur des laits de 1 cm. 1/2 de diamètre ayant 3, 6 et 8 centimètres de hauteur de colonne. De même le tube profond de lait 1 1/2-12 est repiqué sans succès le 30 avril sur gélose inclinée, eau œuf aérobie 1 1/2 diamètre 4 hauteur, laits aérobie 1 1/2-5 et 6 1/2.

C'est un cas d'échec. Voici un cas de transition:

Le tube A₇₁₈ du 26 avril 1906 est un tube eau blanc d'œuf de sporulation aérobie par repiquage d'une culture du premier stade. Il est repiqué avec succès le 26 avril 1907 sur lait profond 1 1/2-16, lait cacheté et sans succès sur des tubes de lait 1 1/2-8, 1 1/2-6, et sur gélose inclinée. Toutefois un tube eau blanc d'œuf 1 1/2-5 cultive abondamment, mais tous les repiquages en tubes bas resteront négatifs. Le lait cacheté est repiqué le 5 mai 1907 sur laits bas de 1 cm. 1/2 avec des hauteurs de 3, 5 et 8 centimètres. Tous ces tubes

donnent tardivement une culture faible avec digestion du lait. Les repiquages ont une vitalité médiocre.

Enfin voici deux exemples d'obtention de l'aérobacille d'Achalme.

Le tube A₉₀₇ de sporulation aérobie est repiqué sur lait cacheté le 9 mai 1907. Le 17 mai, sont repiqués avec succès par ce tube cacheté des tubes de lait, bouillon, et eau œuf aérobie 1 1/2-7. Les ensemencements directs des spores aérobies étaient restés négatifs en tubes bas.

Le tube A₃₉₀ du 14 avril 1906, tube de sporulation aérobie sur eau blanc d'œuf est repiqué directement avec succès le 9 mai 1907 sur lait cacheté, eau œuf aérobie 1 1/2-6 1/2, bouillon gélatiné 1 1/2-6 1/2, lait 1 1/2-4, et lait 1-5. Toutefois la gélose inclinée reste négative. Mais nous nous souvenons combien il est difficile d'obtenir des cultures sur gélose inclinée du bacillus perfringens (bacille d'Achalme).

*
* *

3° A la fin de cette étude de l'aérobisation du bacille d'Achalme, nous voulons revenir sur quelques points dignes de retenir l'attention, ce sont les résultats obtenus en tube étroit, l'évolution des cultures de gélatine, l'étude de l'expérimentation sur les animaux, qui nous mènera à l'immunisation et peut-être à la sérothérapie.

Enfin nous nous demanderons s'il existe un quatrième stade de l'aérobisation.

Tout d'abord donnons quelques expériences concernant le tube étroit. Elles confirment la loi générale du rapport inverse du diamètre et de la hauteur de colonne dans l'obtention des cultures en tube profond.

Le 13 septembre nous repiquons une culture en lait cacheté de bacille d'Achalme sur des tubes de diamètre différent contenant des hauteurs de liquide variables et nous notons les résultats suivants :

Nos tubes de contrôle reproduisent les aspects caractéristiques, éclatement de la gélose profonde, liquéfaction du blanc d'œuf, absence de culture en gélose inclinée.

Tubes de lait de 4 centimètres de diamètre contenant une colonne de liquide de 12, 10, 9 et 8 centimètres. Pas de culture.

Tubes de lait de 2 cm. 1/2 de diamètre. — Culture positive dans le

tube ayant une colonne de lait de 8 centimètres et au-dessus.

Tubes de lait de 2 centimètres de diamètre. — Hauteur nécessaire : 7 centimètres.

Tubes de lait de 1 cm. $\frac{1}{2}$ de diamètre. — Hauteur exigée : 6 centimètres.

Tubes de lait de 1 centimètre. — Hauteur nécessaire : 4 centimètres.

Tubes de lait de $\frac{1}{2}$ centimètre. — Hauteur indispensable : 3 centimètres.

Pipette. — Toutes cultures positives.

La comparaison de ces chiffres avec ceux donnés plus haut surprend par une notable différence. La plus grande facilité de culture dans l'expérience ci-dessus citée provient de l'emploi d'un lait autoclavé deux jours seulement avant l'expérience.

Voici les résultats obtenus le 18 septembre, sur lait.

Pour le diamètre 2 cm. $\frac{1}{2}$, hauteur minima : 12 centimètres.

—	1 cm. $\frac{1}{2}$.	—	9	—
—	1 cm.	—	6 et 5 $\frac{1}{2}$	
—	$\frac{1}{2}$ cm.	—	4 cm.	

Quant au bouillon, voici les chiffres. Pour un diamètre de 1 cm. $\frac{1}{2}$, il faut une colonne de 12 centimètres; le diamètre de 1 centimètre se contente d'une colonne de 8 centimètres, le diamètre de $\frac{1}{2}$ centimètre n'exige plus qu'une colonne de 6 et même 5 centimètres.

D'ailleurs le degré de l'aérobisation est fonction à la fois du diamètre et de la hauteur. Un tube de 1 centimètre de diamètre et de 6 centimètres de hauteur ne correspond point à un tube de même hauteur de colonne, mais à plus grand diamètre. L'expérience suivante le démontre :

Le 26 septembre 1906 nous repiquons sur différents milieux un tube de bacille d'Achalme en lait aérobie de 1 centimètre de diamètre et 6 centimètres de hauteur. Sont positifs les repiquages sur lait aérobie de 1 centimètre de diamètre avec hauteur de 6, 5 et 4 cm. $\frac{1}{2}$. — Au contraire avec un diamètre de 1 cm. $\frac{1}{2}$ il fallut une colonne de 8 centimètres pour avoir une culture positive. Le réensemencement était fait comme d'ordinaire à la pipette avec 7 à 10 gouttes de culture bien développée. La culture est d'autant plus abondante que le milieu est plus abondant — tant il est vrai

que la richesse du réensemencement, si elle est utile, n'est qu'une condition adjuvante de nos expériences.

4° **La culture sur gélatine** nous présente à étudier deux phénomènes spéciaux, qui sont l'aérobisation spontanée par vieillissement ou culture en série et d'autre part la dissociation de la perte du chimisme. Voici les exemples démonstratifs :

Un tube de gélatine Liborius (1 cm. $1/2$ de diamètre et 7 centimètres de hauteur) est ensemencé le 12 septembre 1906 avec une culture cachetée de bacille d'Achalme. Le 18 septembre, toute la gélatine est liquéfiée et le tube forme une culture **pseudo-aérobie** ; à ce moment les repiquages sur lait ne sont positifs qu'en tubes de 1 cm. $1/2$ de diamètre et 9 centimètres de hauteur, conformément à la règle antérieurement établie. Le 8 octobre les repiquages sont positifs sur lait en tubes (1 $1/2$ diamètre, 3 hauteur), mais les essais sur gélose inclinée restent sans résultat. Le 22 octobre, nous avons obtenu sur gélose inclinée deux colonies blanchâtres aplaties, peu saillantes, dont les repiquages ont été négatifs ; le bacille avait perdu sa vitalité dans son effort d'adaptation au milieu ; tous les repiquages de la gélatine en lait et bouillon étaient à ce moment positifs.

Si le simple vieillissement suffit, à plus forte raison la culture en série de tubes Liborius de gélatine. Ainsi un tube de Liborius de gélatine du 12 septembre 1906 a une anaérobiose normale, c'est-à-dire que les tubes de lait (1 $1/2$ -9) donnent des repiquages positifs. Le 2 octobre, ce tube est repiqué sur un tube Liborius de gélatine contenant une colonne de 3 cm. $1/2$ de ce milieu, et le 5 octobre ce nouveau tube peut être repiqué avec succès en lait de 1 $1/2$ diamètre, 3 hauteur.

Le phénomène de la dissociation de la perte du chimisme consiste essentiellement dans ce fait que le bacille d'Achalme, au cours de son aérobisation, peut encore digérer la gélatine, après avoir perdu le pouvoir de digérer le blanc d'œuf et la caséine du lait. Ce fait mérite quelques commentaires.

Les cultures sur gélatine de bacilles d'Achalme obéissent à la loi de l'évolution en trois stades que nous avons établie. Au début, dans la première phase d'aérobisation, les réensemencements en tubes Liborius liquéfient la gélatine, et à la fin de cette phase, des cultures liquéfiantes s'obtiennent en gélatine inclinée à la tempéra-

ture de la chambre. La strie d'ensemencement creuse un sillon comparable au sillon du staphylocoque doré ; au sein de la gélatine liquéfiée, l'examen sur lamelles montre le bacille avec ses propriétés morphologiques et sa mobilité ordinaire. Souvent on ne voit pas à l'œil nu de culture apparente, et la culture est identique à la culture anaérobie sur gélatine inclinée ; quelquefois la culture se développe sous l'aspect d'une bande blanchâtre légère à limites indécises. La culture en série fait passer au deuxième stade, stade où la gélatine n'est plus liquéfiée en culture aérobie, mais peut encore être digérée dans les tubes anaérobies. Enfin arrive le troisième stade où le germe a acquis sa neutralité chimique sur tous milieux et toute culture. Ici, comme dans la série d'aérobisation sur gélose, il sera souvent utile pour éviter l'arrêt de la culture en série de redonner de temps en temps une certaine vitalité au germe, en intercalant entre les séries de tube de gélatine inclinée quelques cultures en lait de 1 1/2 diamètre, 5 hauteur, par exemple.

Le fait important est l'absence de concordance entre le deuxième stade étudié sur gélatine et le deuxième stade étudié sur eau blanc d'œuf ou lait. Comme nous le disions plus haut, le pouvoir de digérer la gélatine se garde plus longtemps que le pouvoir tryptique de digestion du blanc d'œuf et de la caséine. En voici un exemple. Un tube de gélose inclinée contenant une culture de bacille d'Achalme obtenue le 9 juin 1906 est repiqué sur gélatine inclinée. En 48 heures, liquéfaction totale de la gélatine. Après régénération en lait bas, un deuxième tube de culture en gélose inclinée donne des cultures filles aérobies qui liquéfient la gélatine, mais laissent intacts le lait ou le blanc d'œuf malgré leur pullulation. Le 2 septembre 1906 nous repiquons sur gélatine inclinée en tube eau blanc d'œuf aérobie (1 1/2 diam., 7 haut.) non digéré. La gélatine est liquéfiée en 48 heures. Mais ce tube eau blanc d'œuf aérobie est repiqué sur des laits aérobies de 1 1/2 diamètre 5 à 7 hauteur, où le bacille pullule sans modification apparente du milieu. Les repiquages de ces nouveaux tubes sur gélatine inclinée n'ont pas liquéfié.

D'ailleurs si curieux que soit ce phénomène, il ne faudrait pas croire qu'il se produise toujours dans le même sens. Il peut arriver que le pouvoir de digestion de la gélatine disparaisse en premier.

Ainsi le 13 juin 1906 nous repiquons un tube de lait aérobie de 7 centimètres hauteur à digestion tardive sur gélatine inclinée. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le 15 juin, nous repiquons sur gélatine inclinée un tube de lait cacheté anaérobie de reconstitution complètement digéré; la gélatine n'est pas liquéfiée; la culture est d'ailleurs misérable (voir plus haut l'étude de l'anaérobie de reconstitution).

En somme, qu'il y ait perte précoce, fait rare, ou perte tardive de la digestibilité de la gélatine, il semble en tout cas, qu'il y ait dissociation entre la perte de cette fonction et la disparition du pouvoir tryptique vis-à-vis le blanc d'œuf ou la caséine. Au contraire, il nous a semblé toujours y avoir concordance pour la liquéfaction de ces deux substances.

Il est donc probable que la gélatine n'est pas liquéfiée par la diastase qui digère la caséine, la fibrine, et l'albumine de l'œuf. Le bacille sécréterait un double ferment. Ce point appellerait peut-être de nouvelles recherches, car Achalme dans l'étude très attentive qu'il a faite de la sécrétion de trypsine par son bacille conclut à l'unité du ferment, qui est identique à la trypsine du pancréas. « Cette diastase (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 650, 2^e al.) agit puissamment sur la gélatine qu'elle liquéfie, la caséine, la fibrine, la syntonine, l'albumine de l'œuf qu'elle peptonise. Elle se rapproche de la trypsine du pancréas par l'influence qu'exerce sur elle la réaction du milieu : elle a son maximum d'activité en présence de l'alcalinité au tournesol, bien avant l'alcalinité à la phtaléine du phénol. »

5° L'évolution du pouvoir pathogène appelle des considérations analogues.

Sa conservation intégrale pendant le premier stade n'est pas absolue. A la vérité, la variation du pouvoir pathogène, sa diminution et sa modification débutent bien avant la perte du chimisme. Après 4 ou 5 générations de culture en lait profond, le cobaye si sensible au germe anaérobie, dont il est pourrait-on dire le réactif, ne réagit plus à l'inoculation que par une cachexie avec escarre nécrotique sans fermentation gangréneuse; le lapin fait un abcès à pus louable et maigrit progressivement. A la fin du premier stade, les animaux inoculés meurent simplement de cachexie

ou même se cachectisent et guérissent s'ils ne sont pas réinoculés et vivent dans de bonnes conditions. La dose inoculée joue également un rôle des plus importants. Au troisième stade de l'aérobisation, une inoculation massive peut parfois régénérer le microbe et lui rendre sa valeur initiale. Par contre une inoculation d'une culture en lait profond digéré (1^{er} stade) de troisième génération pourra à la dose d'une goutte cachectiser le cobaye, de 7 à 10 gouttes donner un abcès à pus louable, à 2 centimètres cubes tuer de phlegmon gazeux; fidèle image sur l'animal des variations innombrables des maladies humaines.

Voici quelques exemples de ces variations d'action; ils sont empruntés à nos expériences d'inoculation de cobayes : Le cobaye 69 est inoculé le 11 juin 1906 avec 5 centimètres cubes du tube A 22 mai n° 1, lait profond digéré du stade 1; il meurt 48 heures après, mais au lieu d'un phlegmon gazeux, ne présente qu'une nécrose sèche et non putride de la paroi abdominale.

Le bouillon profond est peu pathogène. Le cobaye 53 reçoit les injections suivantes d'un bouillon profond de 24 heures du stade premier : le 23 juin 1 cc.; le 27, 3; le 30, 5 cc.; le 4 juillet 8; le 9 juillet 8; ce n'est qu'après cette dernière dose qu'il se cachectise rapidement et meurt le 13 juillet.

Le cobaye 60 reçoit le 12 juillet un 1/2 cc. d'une culture en gélatine liquéfiée basse du 9 juin. Le 16 juillet nouvelle inoculation de 1 cc.; mort le 21 juillet avec un abcès au point d'inoculation à pus louable contenant le bacille d'Achalme.

Le cobaye 33 reçoit le 16 juillet 1 cc. d'un tube de lait profond digéré du 23 juin; le 21 juillet 2 cc. d'un tube du 27 juin, le 28 juillet 3 cc. d'un tube de bouillon profond du 8 juillet. Il meurt au milieu d'août de cachexie progressive sans abcès.

Le cobaye 62 reçoit les inoculations suivantes : Bouillon profond bouilli, le 1^{er} juin 1906, 1 centimètre; le 4, 5 cc.; le 7, 10; le 11, 10; le 23, 8; le 27, 8. Bouillon profond vivant, le 4 juillet, 2 cc.; le 9 juillet, 5 cc. Le 16 juillet, il reçoit 2 cc. de bouillon profond et 1 cc. de lait aérobie digéré bouilli. De même le 21 et le 28 juillet. En septembre il reçoit des inoculations de lait aérobie digéré bouilli, le 13, 2 cc.; le 26, 3; puis le 2 octobre, 4; le 6, 5; le 13, 1 cc. de lait anaérobie bouilli; le 20, 2 cc. du même tube;

le 26 octobre 1 cc. de bouillon gélatiné profond. Le 3 novembre 2 cc. de ce bouillon.

Le 13 novembre, 1 cc. de lait profond digéré. Le 23 novembre, léger abcès abdominal à pus louable. Le 30 novembre, 2 cc. de lait profond digéré. Le 7 décembre 1/2 cc. de bouillon cacheté. Mort par cachexie rapide le 12 décembre.

6° Existe-t-il une quatrième étape dans l'aérobisation du bacille d'Achalme? — Le bacille ayant tout perdu de ses propriétés primitives, sauf la morphologie, va-t-il perdre cette morphologie et prendre l'aspect et les caractères d'un autre germe? Voilà une question passionnante que nos expériences n'ont pu encore élucider. Toutefois dans une culture sur bouillon gélatiné du 3^e stade en tube 1 1/2-4, nous avons observé une fois sur lamelles le fait suivant. Les bacilles s'étranglaient en leur milieu, et prenaient une forme de sablier, de plus en plus accentuée, jusqu'à produire la transformation du bacille en un diplocoque. Les repiquages devinrent en culture pure de l'entérocoque de Thiercelin. Il nous sembla alors que le bacillo-gène d'Achalme était devenu l'entérobacille de Thiercelin, puis l'entérocoque. C'était la démonstration du transformisme microbien. Mais le fait est resté unique; la seule conclusion à en tirer est la nécessité de faire sur ce point de nouvelles recherches. Nous ne voulons pas tirer parti d'une expérience que nous n'avons pu jusqu'à présent reproduire à volonté.

III. — *Identité du bacille d'Achalme et du bacille de Thirolaix.* — L'aérobisation du bacille d'Achalme nous conduit à étudier à la fin de ce chapitre une question intéressante de Bactériologie médicale, celle de l'identité du bacille d'Achalme et du bacille trouvé par Thirolaix, pendant la vie, dans le sang de 3 rhumatisants. Achalme avait trouvé son bacille à l'autopsie dans le myocarde et les valvules de rhumatisants.

Or en reprenant les 3 notes de Thirolaix à la Société de Biologie (1897, 13 mai, 9 octobre, 6 nov.) on relève les points suivants sur lesquels va porter la discussion. Dans la première note Thirolaix conclut à l'identité des deux germes et propose, à juste titre, de donner le nom de bacille d'Achalme à ce germe. Dans

la deuxième note, l'étude plus approfondie qu'il en fait établit certaines différences. Nous ne parlons point des résultats expérimentaux. Un microbe au sortir de l'organisme peut avoir conservé certaines propriétés d'adaptation; d'ailleurs, l'auteur emploie une technique spéciale (inoculation hypodermique au lapin de 1 à 2 cc. de la sérosité du phlegmon gazeux du cobaye). Laissons de côté également, pour la même raison, le développement formidable de gaz qui fait éclater le tube d'Achalme dans l'étuve.

L'absence de culture sur gélatine de 18-20° nous étonne davantage, ainsi que la conclusion de Thiroloix : « Il ne cultive pas à la température ordinaire ».

Ici encore on peut invoquer l'adaptation considérable à la vie parasitaire de ce germe, et supposer que des tentatives tardives de culture sur gélatine auraient réussi.

L'absence de fétidité des cultures, qui dégagent une odeur butyrique franche, peut s'expliquer par l'intensité du pouvoir fermentatif des hydrates de carbone avec production rapide d'acidité entravant l'action et la sécrétion de la trypsine. D'ailleurs Thiroloix note lui-même l'hyperacidité des cultures.

Enfin Thiroloix écrit : « Après 3 ou 4 passages sur lait ou bouillon, ce bacille qui végète si difficilement alors qu'il provient de l'homme ou du lapin, cultive aérobie sur lait, bouillon ou sérum humain liquide, conservant sa puissance pathogène. » Ce fait restait inexplicable avant nos recherches.

N'est-ce pas là un simple fait d'aérobisation spontanée de cet échantillon si spécial? Nos recherches en permettant de comprendre ce fait bien particulier observé par Thiroloix nous amèneront donc à conclure à l'identité probable du bacille d'Achalme et du bacille trouvé par Thiroloix. D'ailleurs, un certain nombre d'auteurs, ont retrouvé dans les cas compliqués de rhumatisme articulaire aigu (Carrière, Triboulet, Zadok et Coyon en France, etc.) un bacille anaérobie rigoureusement identique au bacille d'Achalme. Ce fait vient à l'appui de l'interprétation d'identité¹.

1. Au cours de recherches récentes (*Soc. médicale des Hôpitaux*, juillet 1907) sur le rhumatisme articulaire aigu nous avons pu démontrer, avec la collaboration de Thiroloix, l'identité des deux germes. Les variations des deux races tiennent à l'adaptation de la vie parasitaire.

C. — LE VIBRION SEPTIQUE (PASTEUR)

Nous allons retrouver dans l'étude du vibrion septique les mêmes faits que dans l'étude du *bacillus perfringens* ; certaines expériences faites avec ce germe ne diffèrent de celles faites avec le bacille d'Achalme que par la désignation du microbe. Avant de relater notre contribution personnelle, il importe de rappeler les grands caractères classiques de cette bactérie.

I. — Le vibrion septique, dont Pasteur lui-même fixait les caractères biologiques dès 1887, est un des microbes les plus anciennement connus. Très répandu dans les milieux extérieurs, il se trouve en abondance sous la forme de spores dans la terre des jardins, dans la vase de certaines eaux. Absorbé avec les légumes, il se rencontre dans l'intestin; fait singulier, il envahit rapidement après la mort le sang des animaux morts d'infection par la bactériémie charbonneuse. Il est désigné en Allemagne depuis les travaux de Koch et Gaffky sous le nom de bacille de l'œdème malin.

Son aspect microscopique est le suivant : bâtonnets longs de 3 à 15 μ , larges de 0,6 à 1 μ , droits ou flexueux et ondulés, le plus souvent de longueur inégale, se groupant volontiers en streptobacilles et formant ainsi de longs filaments sinueux bien différents de la bactériémie charbonneuse. Les bâtonnets sont mobiles; le mouvement n'a pas la vivacité de celui du bacille d'Eberth; c'est un mouvement d'ondulation, de reptation, comme un serpent dans l'herbe (Pasteur); ce mouvement disparaît rapidement par le contact de l'air, aussi les classiques recommandent de le chercher non sur les bords de la préparation où la mobilité s'atténue rapidement, mais en plein centre des lamelles.

Dans les examens faits non avec les sérosités animales, mais avec les cultures, on trouve de nombreuses spores isolées ayant l'aspect morphologique ordinaire des spores et leur réfringence bien connue. De plus l'examen fait reconnaître un grand nombre de spores développées au sein des bâtonnets, soit à leur partie médiane, soit à une de leurs extrémités, car la spore est toujours unique; elle déforme le bacille qui se trouve renflé à sa terminaison

sans que l'aspect rappelle pourtant la baguette de tambour du bacille du tétanos. Dans les humeurs animales, le bacille *in vivo* ne sporule pas. Les spores se colorent par les procédés ordinaires.

Le vibron septique prend facilement les colorations classiques, il garde le Claudius et conserve le Gram. Besson recommande d'utiliser le violet de gentiane phéniqué, de laisser le colorant agir pendant 5 minutes avant le passage dans la solution iodée.

Nous n'insistons pas sur la coloration des cils toujours délicate.

Le vibron septique est d'après les auteurs classiques un anaérobie strict; il pousse entre 13° et 43°, mais sa culture est surtout facile à 37°.

Le bouillon troublé dès la dixième heure laisse pulluler le germe; dès que la culture est âgée de 24 heures, il se forme à sa partie déclive un dépôt fait de spores, de bacilles sporulants et de bacilles altérés.

Avec les classiques, nous pouvons recommander comme milieux de choix les milieux organiques, bouillon additionné de liquide d'ascite, de sérum, de jus de viande filtré à la bougie, d'hémoplasie, le sérum et l'hémoplasie pure.

Le lait est coagulé et digéré. Le sérum n'a pas la transparence du sérum exsudé dans les cultures de bacille d'Achalme, il est louche; de même le coagulum, moins abondant, moins rétracté, semble beaucoup moins dense.

En tubes Liborius de gélose profonde, le bacille se développe sous l'aspect de colonies nuageuses isolées dont les contours se fondent peu à peu dans le milieu.

La culture sur pomme de terre ne donne pas de culture apparente. Le sérum solidifié, le blanc d'œuf en tube d'eau blanc d'œuf cacheté sont rapidement digérés.

Le vibron septique appartient à la classe des bactéries tryptobutyriques d'Achalme. Il digère la gélatine, liquéfie par une trypsine l'albumine, la fibrine et la caséine; fait fermenter le maltose en donnant un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique. L'amidon n'est pas saccharifié.

Nous résumerons rapidement les propriétés biologiques.

Pasteur a décrit la septicémie expérimentale aiguë des animaux due au vibron septique. Chauveau et Arloing lui ont rapporté la

septicémie gangréneuse, l'érysipèle bronzé, c'est-à-dire la gangrène gazeuse foudroyante de l'homme. Ces affirmations restent encore vraies pour la majorité des faits; mais quelques travaux récents et en particulier la thèse de Legros (gangrènes gazeuses) nous ont appris l'existence de la bactérie septique aérobie dont nous reparlerons plus loin.

Davaine a montré que le cobaye et la souris succombent à un millionième de goutte de sérosité septique. Le lapin, le rat blanc, le mouton, la chèvre et le cheval sont très sensibles; pour certains auteurs le chat le serait moins. Le rat d'égout présente un abcès simple au point d'inoculation et ne succombe que par l'inoculation de doses très élevées de culture.

À l'autopsie des animaux sensibles, le poil hérissé pendant la vie se détache de la peau sans effort; un oedème gazeux, fait d'une sérosité oedémateuse, est collecté au point d'inoculation; il imbibe les tissus voisins, soit au sein même du foyer, soit dans les diverticules qui en partent en fusée dans tous les sens; de nombreuses bulles de gaz fétide viennent donner la signature de la fermentation putride des tissus. Pendant la durée de survie de l'animal, le bacille reste cantonné au point de développement du phlegmon gazeux, mais la septicémie survient rapidement après la mort, surtout si on laisse le cadavre quelques heures à l'étuve à 37°. Comme pour le bacille d'Achalme, les spores n'existent pas pendant la vie, elles apparaissent rapidement dans les cadavres surtout s'ils sont mis à l'étuve et dans les pipettes de sérosité prélevée au niveau du foyer après la mort ou même pendant la vie : ces pipettes sont fermées à la lampe et mises à l'étuve.

De nombreux travaux ont été faits sur les toxines du vibrion septique, l'immunisation et la sérothérapie.

Les travaux de Roux et Chamberland, de Besson ont fixé les propriétés des toxines; Besson a étudié les propriétés chimiotaxiques négatives de la toxine et signalé l'innocuité des inoculations de spores pures. La toxine active de Leclainche et Morel, obtenue par culture du vibrion septique en bouillon Martin et simple décantation, tue le lapin en injection sous-cutanée à la dose de 5 à 6 cc., en injection intraveineuse à la dose de 5 à 6 gouttes.

D'après Leclainche et Vallée, on peut préparer un vaccin pour le vibrion septique d'après la méthode imaginée par Arloing,

Cornevin et Thomas pour le charbon symptomatique. Du sang d'un animal mort de septicémie est recueilli dans des pipettes scellées et mis à l'étuve à 37° 5 jours. Ensuite, selon le procédé d'Arloing, le contenu des ampoules est desséché; il constituera un vaccin.

La vaccination du cobaye a été obtenue par Roux et Chamberland par trois injections, faites de 3 jours en 3 jours, de 40 cc. de culture en bouillon chauffée 10 minutes à 110°. Les mêmes auteurs ont obtenu l'immunité par 7 ou 8 injections au cobaye d'un centimètre cube de sérosité d'œdème septique filtré sur porcelaine. Besson l'obtient par inoculation successive de doses d'abord minimales (un dixième de goutte) progressivement augmentées de sérosité septique intégrale.

Leclainche par des inoculations intraveineuses puis intramusculaires de sérosité virulente puis de cultures en bouillon Martin à l'âne, animal presque réfractaire, a obtenu un sérum dont l'effet est trop peu prolongé pour être vraiment utilisable. Signalons une propriété importante du sérum de Leclainche; il agglutine en quelques minutes les cultures jeunes de vibrion en bouillon Martin à une dose variant de 1/30° à 1/3000°. Nous donnerons à la fin de nos recherches une progression de vaccination du cobaye par les cultures aérobisées de *Vibrio* septique.

II. — *Expériences originales.* — Nos expériences sur le vibrion septique seront rapportées dans l'ordre adopté pour l'étude du bacille d'Achalme.

1° Le premier point à signaler est la **mensuration de l'anaérobiose**.

a. **MENSURATION DE L'ANAÉROBIOSE PAR CULTURE EN GAMME ASCENDANTE DE PRESSION.** — Nous rappelons que cette mensuration se fait en tube de lait ou de bouillon de 1 cm. 1/2 de diamètre et 5 centimètres de hauteur. Les tubes sont achalmisés à des pressions variables. Dans ces conditions, tous les tubes à pression inférieure à 36,5 c'est-à-dire à vide supérieur ou égal à 40 centimètres donnent en 24 heures une culture abondante. Entre la pression de 36,5 et 46,5, c'est-à-dire avec un vide de 40 à 30 centimètres, la culture se développe en 2 à 5 jours; elle est d'autant plus tardive et d'autant

moins abondante que la pression est plus forte. Quelques tubes même ne donnent lieu qu'à un développement histologique.

b. MENSURATION DE L'ANAÉROBIOSE PAR CULTURE EN ÉCHELLE DE HAUTEUR. — Nous avons déjà dit que sur lait crémeux, il ne saurait être question de diamètre ou de hauteur; tout tube de lait crémeux est un tube cacheté; le vibrion septique s'y développe abondamment. Le lait écrémé, ensemencé à la pipette dans la profondeur avec 7 à 10 gouttes d'une culture anaérobie, donne en 24 heures une culture abondante avec digestion du lait, à condition que le tube contienne une hauteur de liquide de 9 à 10 centimètres au moins pour un diamètre de 1 cm. $\frac{1}{2}$. L'eau peptonée et le bouillon donnent de beaux résultats au-dessus de 15 centimètres; des résultats satisfaisants au-dessus de 12 cm. $\frac{1}{2}$; entre 11 centimètres et 12 cm. $\frac{1}{2}$, les cultures sont inconstantes et faibles; il s'agit bien entendu de tubes à diamètre de 1 cm. $\frac{1}{2}$.

L'eau blanc d'œuf et l'eau fibrine donnent de belles cultures avec des colonnes de liquide de 11 à 15 centimètres.

Dans toutes ces cultures, le bacille se développe avec les propriétés chimiques, digestion de l'albumine de l'œuf, de la caséine, etc.

2° Il est facile de passer de la mensuration de l'anaérobiose à l'adaptation de la vie aérobie. On y arrive soit par gamme ascendante de pression, soit par culture en tubes profonds de hauteur progressivement décroissante.

a. AÉROBISATION PAR CULTURE EN GAMME ASCENDANTE DE PRESSION. — Si on ensemence dans des tubes de bouillon ou de lait de 1 cm. $\frac{1}{2}$ diamètre et 5 à 6 centimètres hauteur, une culture de vibrion septique en tube d'Achalme fermé à une pression de 40 centimètres, et qu'on les achalmise à pression variable, on obtiendra aisément de belles cultures avec une pression de 45 centimètres par exemple. De 5 en 5 jours la même opération sera refaite, et on arrivera ainsi à une culture vraiment aérobie en lait ou bouillon de 1 cm. $\frac{1}{2}$ diamètre et 6 centimètres hauteur. Pour cette expérience, il est de beaucoup préférable d'utiliser le lait écrémé au bouillon, qui quelquefois peut laisser mourir le germe. Les repiquages sont faits

comme toujours à la pipette avec une quantité suffisante de culture.

b. AÉROBISATION PAR CULTURE EN ÉCHELLE DESCENDANTE DE HAUTEUR. —

La méthode consiste à attendre le plein développement du tube de culture, puis à le repiquer dans un tube où la colonne de liquide a 1 centimètre de hauteur en moins. On peut procéder plus rapidement mais moins sûrement en mesurant l'anaérobiose de chaque tube profond et en utilisant en série le tube de hauteur minima obtenu.

Prenons un tube de lait profond 1 1/2 diamètre, 10 hauteur, abondamment développé; de 5 en 5 jours repiquons en série dans des tubes à colonne 1 1/2-9, 1 1/2-8, etc., nous obtenons aisément une culture repiquable de vibron septique en lait 1 1/2 diamètre, 3 hauteur.

Prenons un tube d'eau blanc d'œuf de 15 centimètres de hauteur et de 1 cm. 1/2 de diamètre. En 5 jours le vibron septique y a pululé. Ensemençons avec ce tube initial un tube 1 1/2-14, il s'y développe une riche culture; 4 à 5 jours après, ce deuxième tube sert à ensemencer un troisième tube et ainsi de suite; on arrive alors au tube 1 1/2-2 centimètres et dans ce tube le blanc d'œuf est digéré, le vibron septique sporule; bref, rien n'est modifié de la bactérie primitive.

L'eau peptonée et le bouillon ordinaire étaient pour le bacille d'Achalmé de piètres milieux. Pour le vibron septique un repiquage de 3 en 3 jours fait aisément passer du tube 1 1/2-14 au tube 1 1/2-3 vraiment aérobie.

Le vibron septique accoutumé à la vie aérobie, après quelques passages sur les tubes de culture à colonne basse finit par donner sur gélose inclinée des cultures d'abord pauvres, puis de plus en plus abondantes. Ces cultures présentent les aspects suivants. Au début, on voit se développer sur la gélose quelques colonies isolées ayant de 1 à 5 millimètres de large, peu saillantes, arrondies, à contours précis, humides, presque crémeuses, d'une teinte opaline ou bleutée (voir fig. 7).

Plus tard, ensemencé dans le liquide de condensation que l'inclinaison du tube étale ensuite à la surface de la gélose, le vibron donne des cultures couvrant la surface de la gélose en nappe sail-

lante, humide, opaline ou bleutée. Les cultures sont identiques, mais plus belles sur gélose sang et sur gélose hémoplasé.

*
* *

Dans toutes ces expériences d'aérobisation, le vibron septique est resté identique à lui-même, c'est-à-dire un microbe à fonction chimique trypto-butyrique, sporulant abondamment dans les milieux neutres, tuant au début les animaux de phlegmon gazeux avec septicémie agonique. La suite de son aérobisation va nous montrer d'importantes modifications. Car le vibron septique évoluera comme le bacille d'Achalme en trois phases; la première que nous venons d'étudier, phase d'intégrité des fonctions chimiques et biologiques; la deuxième, où les fonctions chimiques et biologiques tendent à disparaître dans les cultures aérobies mais se régénèrent dans les cultures anaérobies; la troisième, où en dehors d'artifices spéciaux le bacille semble devenir un microbe sans importance n'ayant plus du vibron septique que le nom.

Il nous faut relever cependant quelques particularités qui appartiennent en propre à l'aérobisation du vibron septique. Les voici :

α. Sans doute à cause de la facilité d'obtention des cultures sur gélose inclinée, les fonctions chimiques sont gardées intactes jusqu'à la deuxième, troisième et même cinquième génération sur gélose inclinée.

β. Le pouvoir chimique résiste plus longtemps à l'aérophilie que le pouvoir pathogène.

γ. Il est facile d'obtenir plusieurs générations successives de culture sur gélose inclinée.

Précisons maintenant quelques points de détail.

Dans la première étape se produit, fait biologique de la plus haute importance, une dissociation entre l'atténuation rapide du pouvoir pathogène et la conservation des fonctions chimiques. Après quelques générations, le vibron septique peut devenir inoffensif. Ainsi le 19 mai 1906 nous inoculons à une souris blanche 2 cc. du tube S.103, culture de 24 heures en lait profond digéré. Ce tube S.103 était un repiquage d'une culture en gélose inclinée V.851 ayant donné une de nos plus belles nappes bleutées. Le 23 mai 1906, cette souris reçoit à nouveau 1 cc. du tube V.13 lait

digéré; elle a parfaitement résisté aux deux inoculations. Le seul phénomène constaté a été l'immobilité de la souris pendant quelques heures après l'injection. Une autre souris a reçu le 25 mai 1906 une inoculation de 2 cc. de bouillon contenant en dilution la moitié d'une culture sur gélose inclinée. Elle a guéri bien que le tube de gélose inclinée eût été obtenu par repiquage du tube S.105, tube aérobie d'eau blanc d'œuf, à digestion rapide.

La perte des fonctions chimiques débute après la 4^e ou 5^e culture sur gélose inclinée obtenue en série. Elle est reculée si on intercale entre les tubes de gélose inclinée quelques passages en lait bas ou en eau blanc d'œuf. D'abord on obtient des réactions chimiques moins franches, tardives, atténuées, incomplètes, comme certains tubes de culture où le lait n'a perdu son apparence normal que le 6^e ou le 10^e jour; puis le pouvoir chimique se supprime, le blanc d'œuf garde ses arêtes, l'eau qui l'entoure devient seulement un peu louche. A ce moment les repiquages parallèles sur milieux anaérobies régénèrent les fonctions chimiques classiques; c'est le stade des anaérobies de reconstitution.

Dans les cultures sur gélatine nous retrouvons le même phénomène, que nous avons signalé en étudiant l'aérobisation du bacille d'Achalmé. Le pouvoir de digestibilité de la gélatine dure pendant tout le 2^e stade et ne s'atténue pour disparaître que pendant le 3^e. Ainsi le 7 septembre 1906 nous repiquons sur gélatine inclinée un tube eau blanc d'œuf anaérobie non digérée et la gélatine est liquéfiée en 48 heures; nous pourrions citer de nombreux exemples de ce phénomène.

Cependant le vibrion septique continuant son évolution d'aérobisation arrive à l'étape de neutralité. Les inoculations à la souris même répétées provoquent à peine un léger malaise, dû plus à la distension des tissus qu'à la nature du germe rapidement phagocyté; bientôt elles paraissent indifférentes. Le lait, l'eau cube de blanc d'œuf paraissent intacts, quoique l'examen sur lamelles montre de nombreux bacilles fins, étroits, allongés, avec quelques formes courtes et trapues, au milieu d'un grand nombre de formes normales. La mobilité est conservée longtemps, encore qu'atténuée.

En dernier lieu la gélatine n'est plus digérée; ainsi les tubes 720 V. et 742 V. eau œuf anaérobie et eau œuf aérobie non liquéfiées repiqués sur gélatine n'ont pas digéré cette substance.

Il était évident *a priori*, c'est un fait que nous avons établi, que la reconstitution en anaérobie pourrait ne pas se manifester à la première génération et reparaitre plus tard. Ainsi à la fin du 2^e stade, souvent un tube eau blanc d'œuf cacheté ensemencé avec un tube de lait intact présente un développement abondant mais non tryptogène. Repiquons ce tube en série : le 2^e tube cacheté d'eau blanc d'œuf louchira, le 3^e donnera une culture tardivement tryptogène, le 4^e sera une véritable culture de reconstitution. Tant il est vrai que tout réside dans l'adaptation au milieu, avec perte ou acquisition progressive de propriétés et de fonctions, dont aucune n'est fonction intégrale du bacille même.

Le même phénomène de reconstitution tardive se retrouve dans les repiquages anaérobies en lait cacheté. Un tube de lait cacheté gardé en armoire, pour démontrer la perte du pouvoir chimique, est retrouvé digéré 15 jours après. Fréquemment nous avons obtenu des reconstitutions chimiques de 4^e et 5^e générations.

Nos expériences ont précisé la valeur de la sporulation aérobie et de l'anaérobie de reconstitution.

L'anaérobie de reconstitution, comme pour le bacille d'Achalme, fait retour au type anaérobie. Nous avons indiqué avec l'étude de ce premier germe quelques précautions de technique sur lesquelles nous ne reviendrons pas.

Voici quelques expériences :

Le tube Vs 110 du 10 mai 1906 est un tube anaérobie de reconstitution obtenu par repiquage en eau blanc d'œuf cacheté d'un tube de gélose inclinée Vs 881 du 4 mai. Le 15 mai 1906 la digestion du blanc d'œuf est presque achevée. Ce jour-là il est repiqué sur le tube S 128 gélose inclinée qui donne en 48 heures une belle nappe homogène. Mais le 30 mai 1906 tous les repiquages sur gélose inclinée échouent.

Le 4 mai 1907 nous repiquons avec le tube Vs 110 des tubes de gélose inclinée qui restent négatifs et un tube de lait cacheté, qui se développe abondamment en 2 jours. Ce tube cacheté est repiqué sur V 7.5.5 eau œuf aérobie 1 1/2 diamètre, 4 1/2 hauteur (négatif); V 7.5.6 lait aérobie 1 1/2 diamètre, 11 hauteur (positif); V 7.5.7 gélose inclinée (résultat négatif); V 7.5.8 lait aérobie 1 1/2 diamètre, 3 hauteur (négatif). Un tube de lait 1 1/2 diamètre 7 1/2 hauteur a donné par exception une culture tardive maigre le 15^e jour. En

résumé l'anaérobie de reconstitution avait la même mensuration d'anaérobiose que le germe anaérobie initial.

La sporulation aérobie du vibron septique produit facilement des races nouvelles. Selon notre terminologie, le vibron septique devient alors l'aérovibron septique. En voici la démonstration :

Le tube Vs n° 2 du 9 mai 1906 vient du repiquage en eau blanc d'œuf du tube de gélose inclinée V 880, sixième génération sur gélose inclinée de vibron septique. Ce tube est repiqué le 7 mai 1907 sur les tubes suivants : gélose inclinée, lait cacheté, eau œuf 1 1/2 diamètre, 14 hauteur; lait 1 1/2 diamètre, 8 1/2 hauteur; lait 1 1/2 diamètre, 4 hauteur; eau œuf 1 1/2 diamètre, 6 hauteur. Dans tous ces tubes, développement abondant de vibron avec toute sa puissance chimique, digestion du blanc d'œuf, digestion de la caséine, etc. Les tubes de lait bas ont eu toutefois un développement tardif. Mais le tube de gélose inclinée a pu être repiqué en série à l'ose sur gélose inclinée et bouillon bas.

Le tube Vs 805 du 25 avril 1906 est une culture de troisième génération en eau blanc d'œuf. Il est repiqué avec succès sur eau œuf aérobie 1 1/2-12 et sur lait cacheté le 5 mai 1907. Le 6 mai le lait cacheté est repiqué avec succès sur V1 lait 1 1/2-5 1.2, V2 lait 1 1/2-3, V3 lait 1 1/2-9, V4 bouillon gélatiné 1 1/2-8. Le microbe s'y développe avec ses caractères spécifiques; la culture se poursuit en série et donne sur gélose inclinée les belles nappes homogènes que nous avons décrites précédemment.

Le 1^{er} mai 1906, Vs 805 avait donné de belles cultures sur gélose inclinée dont il ne faut pas tenir compte.

Ainsi le vibron septique a pu garder son aérobisation, et donner des repiquages positifs, même par réensemencement direct des spores.

Trois points méritent encore d'être étudiés; le premier a trait à l'aérobisation obtenue par les cultures en culot de gélatine; le deuxième se rapporte à nos expériences en tubes étroits; le troisième bien plus important pose la question de l'emploi des cultures aérobisées pour l'immunisation et la vaccination des animaux contre le vibron septique.

La culture en culot de gélatine peut, comme nous l'avons déjà affirmé, servir à l'aérobisation soit par simple vieillissement, soit

par culture en séries de tubes de plus en plus bas. Ainsi le 12 septembre 1906 nous mesurons l'anaérobiose d'un tube Liborius de gélatine de 1 1/2 diamètre, 4 hauteur liquéfiée par le vibrion septique. Elle nous donne les résultats ordinaires; cultures avec digestion du lait en colonne de 1 1/2 diamètre, 9 1/2 hauteur; cultures négatives en lait 1 1/2 diamètre, 6 hauteur. Le 2 octobre 1906, culture positive sur lait 1 1/2-6, le 9 octobre sur lait 1 1/2-4, le 13 octobre on descend 1 1/2 diamètre 2 1/2 hauteur et le 15 octobre un repiquage sur gélose inclinée donne une culture en nappe homogène, selon le type précédemment décrit. Le 22 octobre nous faisons une série de repiquages sur tous milieux; tous sont positifs. Le microbe a gardé, à ce moment, chimisme et pouvoir pathogène.

Voici maintenant un exemple d'aérobisation par culture en série sur tubes Liborius de gélatine :

Un tube de vibrion septique en gélatine Liborius de 1 1/2 diamètre et 4 hauteur s'est développé abondamment le 12 septembre 1906. Il est repiqué le 13 octobre sur un tube de gélatine de 1 1/2 diamètre et 3 hauteur, et ce deuxième tube donne d'emblée des repiquages positifs sur lait de 3 à 4 centimètres de hauteur. Le 22 octobre 1906, le deuxième tube est repiqué sur un troisième tube de gélatine Liborius et cette troisième culture est d'emblée absolument aérobisée, car elle donne sur gélose inclinée de belles nappes homogènes.

4° Nous ne voulons pas à propos du tube étroit rapporter toutes les expériences qui pour le vibrion septique sont analogues aux expériences faites avec le bacille d'Achalme.

Signalons seulement la suivante.

Le 26 octobre 1906, nous faisons une série de repiquages avec un tube de lait cacheté, où s'est développé le vibrion septique. Or nous constatons que sur bouillon, la hauteur utile de liquide est de 12 cm. 1/2 pour un diamètre de 1 cm. 1/2, de 9 centimètres pour un diamètre de 1 centimètre, de 6 centimètres pour un diamètre de 1/2 centimètre.

Sur lait, il faut, comme nous l'avons établi, avec un diamètre de 1 cm. 1/2 une hauteur de 9 cm. 1/2, tandis que le diamètre de 1 centimètre permet la culture jusqu'à 7 centimètres de hauteur.

5° Mais l'immunisation des animaux retiendra plus longtemps notre attention; encore que la rareté des affections à vibron septique, et les procédés antérieurs cités à l'étude générale du germe diminuent de beaucoup l'intérêt de cette étude.

Nous avons pu, grâce à la rapide déchéance du pouvoir pathogène, utiliser les cultures en lait profond digéré de 4^e à 5^e repiquage.

La souris n'est tuée qu'avec des doses considérables. Ainsi le 16 mai 1906 une souris blanche reçoit 2 cc. de lait digéré, et ne meurt que le 9 juin, 24 heures après une deuxième inoculation de 4 cc. La souris β reçoit le 16 mai une inoculation de 3 cc. de lait digéré et meurt le 9 juin, ayant reçu la veille une nouvelle dose de 3 cc.

Le cobaye est particulièrement facile à allobi-vacciner contre le vibron septique. Il supporte admirablement 1 cc. d'une culture dans les conditions énoncées plus haut, alors qu'une dose deux fois plus forte serait mortelle. Les injections suivantes se font de 4 en 4, ou de 8 en 8 jours, en ayant soin de surveiller le poids de l'animal qui ne doit pas baisser entre deux injections. Après 8 à 10 injections à doses progressives, on inocule des cultures anaérobies en bouillon, puis le lait à doses croissantes de 1 à 20 gouttes. Mais souvent on peut d'emblée injecter une forte dose de culture virulente. Ainsi voici la progression utilisée dans la vaccination du cobaye n° 84.

Il a reçu les doses suivantes de culture en lait profond digéré (1 1/2-15) âgée de 15 à 30 jours, et repiquée en conséquence.

7 juin 1906.	1/2 cc.
11 —	1
14 —	1 1/2
21 —	2 cc.
28 —	3
4 juillet	4
9 —	5
16 —	5

Le 21 juillet il recevait une injection de 1 cc. de culture anaéro-bique virulente en bouillon gélatinée âgée de 8 jours; restait blotti dans la cage jusqu'au 23 et guérissait absolument.

*
* *

6° Grâce à l'amabilité du prof. Leclainche, nous pouvons décrire une expérience qui démontre spécifiquement l'identité du **vibron septique** et de notre **vibriogène septique**, c'est-à-dire du vibron aérobisé déchu de ses fonctions fermentatives et de son pouvoir pathogène.

Dans leurs belles recherches sur la sérothérapie des affections dues au vibron septique, Leclainche et Morel (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1901) ont montré que le sérum antisepticémique agglutinait à un taux considérable les cultures de vibron septique. Or ce pouvoir agglutinatif est la dernière propriété que garde le vibriogène septique; de même, nous le verrons plus loin, le bacillo-gène du tétanos garde comme dernière propriété l'agglutinabilité par le sérum antitétanique.

Voici quelques-unes de nos expériences :

Elles ont été faites soit avec des émulsions en bouillon neuf de cultures sur gélose inclinée, soit avec des cultures vivantes en bouillon. Les cultures formolées et les cultures sur lait se prêtent mal à ces expériences.

a.) Si on additionne un tube de bouillon, contenant 6 cc. de ce milieu, de 1 cc. de sérum antisepticémique et qu'on l'ensemence avec un vibriogène récemment obtenu, le bouillon reste clair au lieu de se troubler uniformément et après 48 heures laisse se déposer des flocons denses qui se dissolvent mal dans le liquide par agitation. Sur lamelles, amas et bacilles libres.

b) Si on additionne une culture trouble bien développée de vibriogène en bouillon de 1/10^e de sérum spécifique, la culture s'éclaircit incomplètement et des flocons difficilement émulsionnables se déposent au fond du tube.

Ces expériences ne réussiront que tant que persistera à un taux suffisant la propriété agglutinative. Or cette propriété facile à mesurer décroît assez rapidement.

Le 6 juin 1907 nous mesurons l'agglutinabilité d'un tube de culture en bouillon de vibriogène et nous obtenons les résultats

suivants, après contrôle d'absence d'amas dans la culture :

A 1/2, agglutination massive immédiate.

A 1/10, agglutination massive en 5 minutes.

A 1/50, agglutination par petits amas en 30 minutes ; à ce moment, il ne reste plus de bacilles libres.

Comme contrôle, nous examinons l'action du sérum antidiphthérique sur notre culture.

A 1/2, agglutination massive.

A 1/10, pas d'agglutination après 10 minutes. Quelques petits amas rares au milieu des bacilles libres et mobiles après une heure. Le pouvoir agglutinatif du sérum de Leclainche et Morel est donc spécifique. Avant de disparaître, il se maintient très longtemps au taux de 1/2, nouvelle analogie, comme nous le verrons, avec l'action du sérum antitétanique sur le bacillo-gène du tétanos.

Nos expériences de contrôle nous ont montré que le sérum normal de cheval avait un pouvoir agglutinatif sur le vibrion septique : ce fait ne nous paraît pas avoir été signalé dans les traités classiques ; il est à rapprocher de l'action immunisante, inconstante d'ailleurs (Leclainche et Morel), du sérum ordinaire de cheval contre les affections à vibrion septique.

III. — *Rapports du vibrion septique et de la bactérie septique aérobique de Legros.* — A la suite de cette étude de l'aérobisation du vibrion septique, nous voulons préciser les rapports qui peuvent exister entre le vibrion septique aérobisé et la bactérie septique aérobique de Legros, dont l'existence est aujourd'hui reconnue par tous les bactériologues. L'intérêt de ce parallèle est facile à saisir ; car il est de la plus haute importance pour nous de pouvoir affirmer que la bactérie septique de Legros peut être considérée comme une forme d'aérobisation spontanée du vibrion septique ou d'un anaérobique voisin. Entrons dans la discussion exacte :

Entre le vibrion septique aérobisé au premier stade et la bactérie septique aérobique, existent quelques différences des fonctions biologiques, chimiques et pathogènes ; elles sont importantes, mais non fondamentales.

La mobilité du germe de Legros est considérable : « Les mouvements (thèse, p. 28) sont rapides, comparables à ceux de jeunes

bacilles d'Eberth ». Au point de vue de l'aérobiose, signalons ce fait. « Nous l'avons maintenu, dit Legros, pendant 6 mois et une série de 15 passages successifs dans des conditions de vie strictement anaérobie sans voir varier au bout de ce temps ses aptitudes primitives ». Il serait capital si nous n'avions vu que la sporulation aérobie du vibron septique crée une race nouvelle fixée dans son degré relatif d'anaérobiose.

Nous passons rapidement sur le voile qui se forme en 16 à 20 heures à la surface des cultures en bouillon de bactérie septique aérobie. Malgré la digestion commune de l'albumine de l'œuf, avec formation d'H²S et d'ammoniaque, etc., malgré la réduction commune des nitrates, nous notons dans les fermentations des hydrates de carbone d'importantes différences. Alors que le vibron septique digère le blanc d'œuf en présence de la glycérine, ce qui veut dire qu'il ne fait pas fermenter la glycérine (Achalme, *loco citato*), la bactérie de Legros attaque, il est vrai lentement, cet hydrate de carbone. La glycose et le galactose fermentés par le microbe de Legros sont respectés par le vibron de Pasteur, de même l'amidon, etc. Ce sont là les plus gros écueils à la thèse d'identité. Les sérosités organiques non coagulées recueillies aseptiquement sont très favorables à la bactérie aérobie, indifférentes ou même peu utilisables (Achalme) par le vibron. La virulence est moindre. L'inoculation au cobaye de la bactérie septique aérobie en culture donne une tuméfaction passagère du membre inoculé, en culture mixte une escarre locale assez limitée et à cicatrisation rapide. Il faut ajouter à la culture un autre germe pathogène pour tuer de septicémie les jeunes cobayes. Seule l'addition d'acide lactique au cinquième reproduit le phlegmon gazeux avec ses désordres épouvantables.

Le passage en série par le cobaye ne dispense pas après six passages de l'addition d'acide lactique; le lapin succombe rarement après inoculation sous-cutanée. Mais nous avons vu s'atténuer rapidement la virulence du vibron septique aérobisé. En résumé, la bactérie septique aérobie de Legros peut être considérée comme une forme atténuée par l'aérobisation sinon du vibron septique dont elle diffère par les fermentations produites, au moins d'un anaérobie voisin de ce vibron.

D. — LE BACILLE GRACILE ÉTHYLOGÈNE
(P. ACHALME ET G. ROSENTHAL)

Nous avons, en collaboration avec Pierre Achalme, donné à la Société de biologie la description suivante de ce bacille anaérobie strict. Nous l'avions trouvé dans l'estomac d'un malade atteint de gastrite avec troubles nerveux; il était uni à l'entérocoque, au bacille d'Achalme et à un microbe voisin du fadenbacille.

1. — Le *bacillus gracilis éthylicus* a la dimension du bacille d'Eberth. Rectiligne ou légèrement recourbé, souvent isolé, quelquefois en chaînettes de deux à quatre éléments, il est très mince, grêle, légèrement granuleux; bien qu'immobile, il présente quelques mouvements d'ondulation sur place. C'est un anaérobie strict. Il se colore facilement par les réactifs ordinaires, prend le Gram et le Claudius. Toutefois dans les vieilles cultures, un certain nombre d'éléments deviennent agramiens et ne résistent point à la décoloration. Il ne pousse pas à la température de la chambre, mais ne perd pas sa vitalité dans ces conditions: les tubes gardés plusieurs jours à 22° puis remis à l'étuve donnent une culture abondante.

En bouillon cacheté, ou en bouillon tube d'Achalme, il trouble légèrement le milieu qui redevient clair et laisse déposer des flocons. En gélatine cachetée, à l'étuve, il ne liquéfie pas la gélatine. En eau peptonée cachetée, mêmes caractères que sur bouillon. La culture en eau peptonée, bouillon, eau peptonée-urée donne par l'épreuve de l'HCl et du réactif de Nessler les réactions de l' AzH^3 . Pas de réaction de l'indol, pas de réduction des nitrates. Le lait cacheté additionné ou non de carbonate de chaux est coagulé en 5 jours environ. La coagulation se fait en masse; les jours suivants, le coagulum se rétracte et laisse exsuder un sérum abondant, en même temps que le gaz dégagé en grande quantité refoule la bague de lanoline. La caséine n'est pas redissoute; les repiquages faits avec le laitensemencé et non encore coagulé restent le plus souvent négatifs. Sur eau gélatine, eau caséine, eau urée pas de développement; sur eau blanc d'œuf développement misérable,

mais positif et permettant sa séparation élective des autres microbes qui meurent dans ce milieu.

En gélose mannitée profonde (tube de Liborius), le bacille donne en plusieurs jours un développement de petites colonnes punctiformes ayant la grosseur d'une tête d'épingle. Si l'ensemencement est pauvre, on obtient quelques colonies espacées de dimensions plus grandes à forme assez irrégulière. La culture dans ces tubes est toujours lente à apparaître; les repiquages sont négatifs après quelques semaines, tandis que la vitalité reste considérable dans les séries de tubes cachetés et n'exige que des repiquages faits de 15 en 15 jours.

Fait important, le bacille gracile éthylogène acquiert rarement un développement notable dans les cultures pures (eau peptonée et eau peptonée hydrate de carbone). Par contre, l'addition de staphylocoque blanc ou doré par exemple provoque une prolifération considérable, phénomène analogue au satellitisme du coccobacille de Pfeiffer et à la symbiose du strepto-bacille fusiforme (Soc. de Biologie, 15 mars 1902).

Ce microbe est peu sensible aux acides, ou aux alcalis; il pousse bien sur eau peptonée acidifiée avec l'acide lactique, ce qui cadre bien avec son origine stomacale mais donne aussi de belles cultures dans l'urine franchement ammoniacale.

Au point de vue des fermentations, cultivé en eau peptonée hydrate de carbone, il ne fait pas fermenter l'amygdaline, mais il fait fermenter la glycérine, le glucose, le lactose, la mannite, saccharifie l'amidon et intervertit le saccharose. Dans cette fermentation se produisent un développement abondant de gaz, et un mélange d'acides volatils composé d'acide acétique et butyrique (méthode de Duclaux), plus une notable quantité d'alcool. La présence de l'alcool est reconnue aisément par le phénomène des stries pendant la distillation, et par la réaction de l'iodoforme. Le compte-gouttes de Duclaux donne pour le premier tiers de cultures distillé 115 à 120 gouttes par centimètre cube.

Nous avons vérifié ce phénomène par la méthode de Nicloux : 150 centimètres cubes de culture en eau peptonée glucosée contenaient après un mois d'étuve 0 cc. 75 d'alcool, et un autre ballon de même contenance avait produit en 12 jours 0 cc. 43. Des cultures en milieux glycélinés ont donné 0 cc. 70 et 0 cc. 41 dans les

mêmes laps de temps. D'une façon générale, il se forme 5 à 7 p. 1000 d'alcool que Nicloux a reconnu être de l'alcool éthylique.

En inoculation de 2 à 5 centimètres cubes, le bacille gracile éthylogène a tué le cobaye en quelques jours en produisant un abcès local où pullule le germe, et des dégénérescences viscérales sans infection généralisée, mais avec un amaigrissement des plus marqués. Le lapin inoculé sous la peau ou dans les veines de l'oreille a succombé en présentant les mêmes phénomènes.

En inoculation en série à petites doses, on peut tuer le cobaye en un temps variant de 3 semaines à 5 mois. Pas d'abcès au point d'inoculation, mais une cachexie lente et progressive malgré l'intégrité de l'appétit.

En résumé, le bacille gracile éthylogène bien caractérisé par la fermentation alcoolique du lait établit une transition entre les groupes buthyrogène et éthylogène des bactéries.

II. — *Expériences d'aérobisation.* — Les expériences que nous avons faites sur l'aérobisation du bacille gracile éthylogène ont été effectuées au moment où notre technique n'était pas encore absolument réglée, d'où une certaine différence avec celles réalisées avec les autres germes.

Nous avons employé le procédé de décachetage temporaire ou de délanolisation. Pour appliquer ce procédé, il suffit, après avoir liquéfié au brûleur du bec Bunsen la colonne de lanoline, de l'aspirer avec une pipette; on transforme ainsi un tube cacheté en tube ordinaire; et une manœuvre inverse permet de rétablir au besoin l'anaérobiose.

Aussi, alors que toute tentative de culture sur bouillon ou lait aérobie avait échoué de novembre 1902 à janvier 1903, nous eûmes par ce procédé à partir de février des résultats progressifs.

Un tube de lait cacheté est délanolisé pendant 24 heures, puis recacheté pendant une journée pour être décacheté à nouveau pendant 2 jours. Il nous sert à ensemercer un lait crémeux, véritable tube cacheté, qui donne un développement assez riche. Les tubes de gélose inclinée servant de contrôle, ensemençés parallèlement, demeurent stériles.

Mais ce tube de lait crémeux donne en laits profonds des résul-

tats positifs; après 3 passages, on obtient une culture pauvre sur bouillon ordinaire, et sur gélose inclinée, le long de la strie d'ensemencement apparaît un léger dépoli formé de microbes ayant l'aspect morphologique décrit. Les repiquages sur milieux aérobies des cultures aérobisées restent stériles; par contre, en milieux anaérobies, le bacille retrouve sa vitalité. Une nouvelle tentative d'aérobisation moins rapide nous donne en mars des cultures abondantes sur lait ordinaire, bouillon, eau peptonée hydrate de carbone et gélose inclinée.

Mais jamais les cultures faites au contact de l'air n'ont eu la vitalité des cultures anaérobies. Le bacille gracile éthylogène peut donc devenir un **aérobie temporaire**, ainsi que nous le dirons par analogie avec l'appellation d'anaérobie temporaire, qui s'applique aux germes aérobies saprophytes ou pathogènes ne poussant parfois au sortir de l'organisme que dans les tubes anaérobies. On pourrait dire aussi que le bacille étudié est devenu un **aérobie facultatif**.

Mais ce qui démontre bien l'identité des germes cultivés, ce qui exclut toute possibilité d'erreur, ce sont les distillations faites avec les nouvelles cultures; elles redonnent un mélange peu abondant d'acide acétique et butyrique et un chiffre d'alcool éthylique presque identique à ceux trouvés avec les cultures initiales (4 à 6 p. 1000). Les hydrates de carbone fermentant sont les mêmes. Le cobaye inoculé sous la peau avec la culture, de quelque origine qu'elle fût, mourait de cachexie progressive, comme le lapin inoculé dans la veine marginale. Ainsi le lapin n° 50 inoculé le 24 mars 1903 avec une culture abondante sur bouillon glucose, meurt le 4 avril dans un état de profonde cachexie. Le cobaye 78 pesant 530 grammes est inoculé le 16 avril avec une culture aérobie; il meurt le 21 pesant 420 grammes, etc.

A cause de la faible vitalité de ce microbe aérobisé, ou du moins de l'échantillon rencontré dans notre étude, nous n'avons pu vérifier l'existence des deuxième et troisième étapes. Mais la première étape d'aérobisation nous montrait comme les autres anaérobies l'intégrité des fonctions chimiques, biologiques et pathogènes.

E. — LE BACILLE DU TÉTANOS ET SON AÉROBISATION

Nous n'avons ni le désir ni la prétention d'écrire une monographie du bacille du tétanos; un gros volume ne saurait y suffire : Nous voulons simplement reproduire dans ses grandes lignes les caractères essentiels morphologiques, biologiques et expérimentaux de ce germe si intéressant par sa profusion dans la nature, qui contraste heureusement avec la rareté de ses méfaits. Nous suivrons dans cette revue rapide les traités classiques de Macé, Besson, Bezançon, etc...

I. — Le bacille du tétanos découvert par Nicolaïer est extraordinairement répandu; on le trouve dans la terre, dans les excréments des animaux, dans la vase où abondent des spores. L'inoculation d'un peu de terre de jardin au cobaye le fait mourir soit de la septicémie de Pasteur, soit de toxhémie tétanique.

L'aspect morphologique du bacille du tétanos varie dans les cultures et dans les foyers d'inoculation.

Dans les cultures jeunes, c'est un bâtonnet très fin, allongé, à extrémités rectangulaires mesurant environ $4\ \mu$ de long et $0\ \mu\ 4$ de large, légèrement mobile, ne traversant pas rapidement le champ du microscope, mais se déplaçant d'un mouvement lent et flexueux, muni de cils nombreux, longs et sinueux, insérés sur les parties latérales. Mais après le 10^e jour dans les cultures faites à 22°, au bout de 36 à 48 heures dans les cultures faites à l'étuve à 37°, quelquefois même dans le pus, on trouve les formes sporulées, bâtonnets grêles, plus courts, portant exactement à leur extrémité, et à une seule de leurs extrémités, une petite sphère réfringente d'un diamètre triple environ de la largeur du microbe. Le bacille sporulé est immobile : c'est la forme en épingle.

Dans les vieilles cultures, le corps du bâtonnet se désagrège et bientôt on ne trouve plus que les spores mêlées à des formes d'involution massuées, courbées, en haltères, moniliformes, etc.

Le bacille du tétanos prend le Gram et le Claudius; la spore se colore par la technique ordinaire. La méthode de Ziehl donne de bons résultats.

Le bacille du tétanos est « moins exigeant (sous le rapport de l'anaérobiose) que le vibrion septique : il peut se développer dans des milieux contenant de petites quantités d'oxygène et s'accoutumer à vivre dans un air faiblement raréfié. Dans la pratique des cultures il faut néanmoins le traiter comme un anaérobie strict ».

La culture est possible de 15° à 44°, surtout abondante de 37 à 39°; il pousse sur tous les milieux; le bouillon Martin lui est très favorable, tandis que les milieux organiques non sanglants comme l'albumine et le sérum donnent des résultats médiocres.

En bouillon, le bacille trouble le milieu qui s'éclaircit vers le 15^e jour avec formation d'un dépôt abondant, la culture dégage des gaz abondants et une forte odeur de corne brûlée. Il y a élaboration d'indol.

En gélatine, développement de colonies ayant l'aspect de petits points nuageux d'où partent des aiguilles concentriques disposées en auréole; la liquéfaction commence à partir du deuxième jour.

En gélose Liborius, aspect analogue, naturellement sans liquéfaction. Le lait est digéré sans être coagulé.

Sur pomme de terre, développement pénible. Vaillard et Vincent ont obtenu sur ce milieu en culture anaérobie des colonies en couche mince, humide, luisante, assez semblables à celles que donne le bacille typhique. Ces colonies sont composées de très longs bâtonnets non sporulés.

Debrand a obtenu des cultures aérobies mixtes de bacilles du tétanos et de subtilis; dans ces conditions, les propriétés du bacille restent intactes.

D'après Achalme, le bacille du tétanos liquéfie la gélatine, digère le blanc d'œuf par sa sécrétion de trypsine, mais ne fait fermenter aucun des hydrates de carbone usuels; il ne saccharifie pas l'amidon et n'intervertit pas la saccharose.

La spore du bacille du tétanos est très résistante; une ébullition d'environ 10 minutes est nécessaire pour amener sa destruction.

Inoculé aux animaux dans certaines conditions, le bacille du tétanos leur donne la maladie spécifique. Les souris, rats et cobayes sont très sensibles, le lapin résiste un peu mieux; le chien est difficile à infecter; le pigeon et la poule sont réfractaires. La maladie est reproduite par inoculation de terre (procédé non rigoureux puisque la nature des germes injectés est indéterminée), par inoculation de

cultures pures — elle n'est pas reproduite (Vaillard, Vincent et Rouget) par inoculation des spores pures à moins qu'on n'y ajoute soit une culture d'un microbe fût-il non virulent, soit une substance de chimiotaxie négative comme l'acide lactique (1/4 cc.); toutefois l'inoculation faite au sein d'une plaie contuse, insuffisamment protégée par l'impossibilité de la phagocytose, est souvent mortelle. Cette innocuité de la spore pure s'oppose heureusement à son ubiquité et à sa résistance aux agents physiques; elle explique la rareté du tétanos, comme elle permet de comprendre le tétanos *a frigore*, et le tétanos dit médical ou sans plaie.

L'exposition des spores desséchées à la lumière diffuse leur imprime des modifications profondes qui sont pour nous du plus haut intérêt.

D'abord la germination de la spore est moins rapide; la culture moins abondante; puis les bacilles cessent d'être sporogènes et pathogènes; plus tard la spore perd la faculté de germer. Par contre Vaillard et Vincent ont obtenu des cultures actives avec des spores insolées pendant 59 heures, mais à l'abri de l'air.

Les travaux de Knud Faber, Vaillard et Vincent ont montré que la toxine du bacille du tétanos est aussi nocive que la culture complète. Inoculée à l'animal à dose suffisante, elle reproduit le tétanos typique. Vaillard et Vincent ont obtenu des toxines qui tuent le cobaye au 1/1000^e de centimètre cube et la souris au 1/100 000^e. La toxine tétanique a une affinité particulière pour le tissu nerveux, affinité qui peut se manifester *in vitro* (Wassermann, Takaki, Metchnikoff, etc.). L'ingestion de toxine est en général inoffensive.

La question de la vaccination et celle de la sérothérapie antitétanique ont été résolues par différents expérimentateurs.

D'abord Behring et Kitasato vaccinèrent des lapins par inoculations combinées de toxine et de trichlorure d'iode, selon le procédé employé pour la vaccination antidiphthérique.

Brieger, Wassermann et Kitasato emploient la méthode infidèle du mélange de culture et de bouillon de thymus. Tizzani et Cattani inoculent des cultures atténuées.

Il faut arriver aux travaux de Vaillard, de Roux et Vaillard pour arriver à la solution véritable du problème.

Voici la technique de Vaillard, pour l'immunisation du lapin.

A 3 jours d'intervalle, on injecte dans une veine de l'oreille

deux doses de 10 cc. d'une culture filtrée chauffée pendant une heure à 60°. Cinq jours après, on injecte 10 cc. du même filtrat chauffé une heure à 55°; enfin après un nouveau délai de 5 jours, on injecte 10 cc. de la culture chauffée à 50° pendant une heure. Dès ce moment l'animal est immunisé; on renforce ensuite l'état réfractaire au moyen d'injections de cultures filtrées pratiquées tous les 8 à 10 jours à des doses croissantes de 5, 10, 15, 30 cc..

Voici, résumée d'après Roux et Vaillard, l'immunisation d'un lapin.

Le premier jour l'animal reçoit sous la peau 3 cc. de toxine tuant la souris à 1/4000°, additionnée de 1 cc. de solution de Gram. Le cinquième jour on injecte de même 5 cc. de toxine + 2 cc. de solution de Gram. Le neuvième jour, on donne 12 cc. de toxine + 3 cc. de solution de Gram. Le dix-septième jour l'immunisation de l'animal est obtenue; son sérum présente la propriété antitoxique; on peut dès lors lui donner de 8 jours en 8 jours 5, 10, 20, 30, 40 cc. de toxine pure; plus tard on rapprochera les injections et on les pratiquera dans le sang ou le péritoine; on peut arriver à donner d'un seul coup jusqu'à 100 à 200 cc. de toxine.

Le cheval est immunisé par une technique analogue.

Avant les injections de toxine, Behring injecte aux chevaux un mélange de toxine et d'antitoxine.

Depuis les travaux de Behring et Kitasato, on connaît les propriétés thérapeutiques du sérum des animaux immunisés. Il faut environ 3 mois pour pouvoir utiliser le sérum d'un cheval dont on entretient l'immunité par des injections hebdomadaires de fortes doses de toxine.

Nous ne pouvons entrer ni dans le détail ni dans la discussion des applications du sérum. En se rapportant aux travaux de Roux et Vaillard, on peut dire que le sérum antitoxique prévient sûrement le tétanos lorsqu'il est injecté avant la toxine tétanique. L'injection simultanée de sérum et de toxine laisse se développer un tétanos bénin local. Lorsque l'injection de sérum succède à l'injection de toxine, les guérisons sont d'autant plus fréquentes que l'intervalle entre les deux injections est plus court.

En pathologie humaine, le sérum se montre tout-puissant pour la prophylaxie du tétanos et les médecins ont accepté la pratique de Nocard, c'est-à-dire l'inoculation préventive de sérum dans le traitement des plaies suspectes. Malheureusement en cas de tétanos

déclaré, les résultats sont variables, et médiocres, même avec la technique de l'inoculation intracérébrale (Roux et Borrel).

Il est donc permis de faire, dans une voie illustrée déjà par de si beaux travaux, de nouveaux efforts.

Signalons, en terminant cette revue trop rapide de la biologie du bacille du tétanos, la propriété agglutinative du sérum antitétanique.

Alors que le sérum humain, prélevé à l'état de santé ou de maladie, n'a aucune action agglutinante, que le sérum normal de cheval et d'âne agglutine le bacille du tétanos au taux de 1 p. 100, le sérum antitétanique agglutine les cultures jusqu'à la proportion de 1 p. 50 000. Cette propriété nous servira dans le contrôle de nos recherches.

II. — *Expériences originales.* — Nous n'avons pas donné au bacille du tétanos la place d'honneur dans nos recherches, malgré son importance dans la pathologie vétérinaire et médicale, parce que son caractère anaérobie n'est pas absolu.

1° A ce propos il faut rappeler les remarquables expériences de Vaillard et Vincent, et signaler les résultats de Valagussa, Ferran, Belfanti et Pescarolo, Sanchez Toledo et Veillon.

Dans leur mémoire des *Annales de l'Institut Pasteur* 1891, p. 4), Vaillard et Vincent disent de ce germe : « Il se développe en vase ouvert dans des milieux disposés en couche épaisse, pourvu que l'accès de l'air soit assez limité. Ainsi on obtient des cultures abondantes et rapides sur les milieux bouillon, gélatine, gélose, non purgés d'air, dans un tube étroit bien rempli et hermétiquement clos, ou bien dans une pipette ordinaire simplement étranglée au-dessus du niveau du liquide et sans qu'il soit nécessaire d'obturer l'extrémité ouverte. Les cultures ainsi obtenues sont très actives. Toutefois les cultures strictement anaérobies correspondent le mieux aux propriétés biologiques du microbe. »

D'après Macé, le caractère relatif de l'anaérobiose du bacille tétanique explique la possibilité de sa croissance dans les cultures impures où l'oxygène est en majeure partie absorbé par les espèces étrangères; on pourrait l'habituer à croître dans un air à peine raréfié sans lui voir perdre ses propriétés.

Il y a longtemps, Lampiasi (5^e réunion de la Société italienne de Chirurgie tenue à Naples en 1888) aurait obtenu des cultures pures d'un bacille sporogène cultivable à l'air sur tous les milieux, dont l'inoculation au lapin et au cobaye produirait le tétanos (?). Ce bacille venait du sang d'un homme et de deux marins atteints de tétanos.

Le 31 mai 1889 Belfanti et Pescarolo font à l'Académie de médecine de Turin une communication intéressante (Voir *Centralblatt für Bakteriologie*, 20 août et 30 septembre 1889). Ils obtiennent des cultures aérobies virulentes; mais notent que dans la vie aérobie, le bacille modifie sa morphologie; elle varie d'un bâtonnet court et presque arrondi jusqu'à celle d'une baguette de tambour. La virulence du bacille est proportionnelle à l'odeur de putréfaction que dégage la culture, elle varie en intensité sans règle fixe. En cas d'atténuation, la culture faite avec une atmosphère d'hydrogène fait reparaître les propriétés pathogènes.

Sanchez Toledo et Veillon décrivant les cultures en gélatine Liborius disent (*Archives de Médecine expérimentale*, 1890, p. 723) : « Les nuages se développent et s'étendent à mesure que la culture vieillit, et arrivent quelquefois, lorsque la culture est très abondante, à effleurer la surface supérieure de la gélatine. Il semble donc que la culture qui n'a pu commencer qu'à l'abri de l'air peut, une fois qu'elle est en train, se continuer quelquefois en sa présence comme si le bacille secrétait quelque substance capable de réduire l'oxygène ou comme si le développement des gaz leur faisait une atmosphère isolante en se dissolvant dans la partie supérieure de la gélatine... » Ce phénomène auquel les auteurs suivants ont paru attacher plus d'importance que S. Toledo et Veillon eux-mêmes, se retrouve d'ailleurs dans la culture en gélose et gélatine Liborius d'un grand nombre d'anaérobies; il n'empêche pas d'ailleurs les auteurs d'affirmer (p. 725), deux pages plus loin, que le bacille du tétanos est strictement anaérobie.

Valagussa (*Annal. d'igiene sperim.*, VIII, 1898, p. 396), au lieu d'employer les cultures mixtes comme fit Debrand, cultive le bacille du tétanos en culture aérobie dans des bouillons filtrés où se sont développés antérieurement certains germes favorisants comme le bacillus subtilis, le bacillus fluorescens liquefaciens, le proteus vulgaris. Les caractères extérieurs des cultures sont peu

modifiés; mais à l'examen, on trouve des bâtonnets de 3 à 5 μ tout à fait immobiles; de plus le microbe est bien plus fragile et ne fabrique plus sa toxine spécifique. Mais il recouvre son pouvoir toxique à la longue dans les cultures anaérobies, en vivant à l'abri de l'air, au contact de toxine tétanique virulente ou des produits de culture de saprophytes.

Citons enfin le travail de Ferran (*Centralblatt für Bakteriologie*, XXIV, 1898, p. 27) qui aurait obtenu des cultures aérobies par l'agitation répétée d'une culture en bouillon anaérobie soumise au contact de l'air.

* *

2° Le bacille du tétanos obéit aux lois générales de l'aérobisation tout en présentant quelques caractères un peu spéciaux que nous allons préciser; les voici :

Les résultats des expériences ne sont pas aussi constants que les résultats obtenus dans nos recherches sur les autres anaérobies. Dans une série même de tubes profonds ordinaires, larges ou étroits, on peut parfois trouver certains tubes négatifs, bien que des tubes plus aérobisés aient donné des cultures; c'est le phénomène de l'**aérobisation déréglée**. D'autres fois, deux tubesensemencés de la même façon, dans les mêmes conditions, donnent, l'un un résultat positif, l'autre un résultat négatif : c'est l'**aérobisation irrégulière**.

Fait plus particulier : dans les contrôles sur gélose inclinée de nos expériences d'aérobisation, alors que l'aérobisation est loin d'être achevée, un tube de gélose donnera accidentellement une abondante culture. Les repiquages de ce tube sont tous négatifs; le germe a épuisé sa force dans cette **aérobisation par bonds**, adaptation trop rapide à la vie vraiment aérobie.

Enfin, au fur et à mesure de son aérobisation, le bacille tend à devenir moins mobile. Des formes d'involution se montrent dans les premiers tubes, puis le microbe prend une forme plus courte et plus trapue. En même temps, le pouvoir sporogène diminue dans les milieux ordinaires pour persister plus longtemps dans les milieux albumineux. La spore se détache alors rapidement du corps microbien, comme dans les cultures du bacillus perfringens.

Sous ces réserves, on peut établir les faits suivants de mensuration de l'anaérobiose et d'aérobisation.

Si l'on ensemence à la pipette dans les parties basses, avec 7 à 10 gouttes d'une culture anaérobie en tube cacheté bien développée, des tubes profonds de lait, voici les résultats obtenus :

Tous les tubes contenant du lait crémeux poussent, quelle que soit leur hauteur ou leur diamètre; car il s'agit de véritables tubes cachetés.

Tous les tubes profonds de lait écrémé ayant un diamètre de 1 cm. $\frac{1}{2}$ et une hauteur de colonne de liquide de plus de 10 centimètres donnent une culture abondante. Les tubes de 9 centimètres donnent des résultats irréguliers et tardifs. Dans les tubes de 8 à 7 cm. $\frac{1}{2}$, le bacille végète quelquefois sans altération chimique du milieu : ce sont les cultures que nous avons dénommées histologiques.

Dans les tubes étroits de lait, c'est-à-dire dans les tubes ayant $\frac{1}{2}$ centimètre de diamètre, les cultures sont positives franchement jusqu'à 6 centimètres. Des hauteurs de colonne de 4 cm. $\frac{1}{2}$ et 4 centimètres donnent encore des résultats appréciables: En tubes capillaires, culture positive quelle que soit la hauteur de colonne du liquide, d'ailleurs avec des résultats irréguliers.

Dans les tubes de 1 centimètre de diamètre, la hauteur de 8 centimètres est suffisante. Par contre les tubes de culture de 2 cm. $\frac{1}{2}$ de diamètre exigent pour donner une culture une hauteur de 16 centimètres de colonne de lait.

Le bouillon et l'eau peptonée donnent les résultats suivants, qui sont surtout nets si on utilise un milieu liquide d'eau peptonée glucose gélatine facile à préparer et très favorable à la culture du bacille du tétanos.

Dans les tubes ayant 1 cm. $\frac{1}{2}$ de diamètre, belle culture en 24 à 36 heures au-dessus de 18 centimètres de hauteur de liquide; belle culture en 24 à 96 heures au-dessus de 15 centimètres. De 12 à 15 centimètres on obtient des résultats tardifs, capricieux et irréguliers. Quelquefois, par exception, des tubes de 9 à 12 centimètres ont donné des cultures peu vivaces.

Les tubes larges d'un diamètre de 2 cm. $\frac{1}{2}$ ne donnent de culture qu'avec des hauteurs beaucoup plus grandes.

Si on diminue le diamètre des tubes, la hauteur de colonne

minima diminue également comme pour le lait : avec les tubes de 1 centimètre, hauteur minima 10 à 12 centimètres;

Le tube étroit de un 1/2 centimètre donne comme toujours des résultats intéressants; on peut descendre à 6, 5 1/2, quelquefois 5 centimètres.

L'eau blanc d'œuf et l'eau fibrine peuvent être utilisées à cause de la fonction tryptique du bacille. Ces milieux donnent des résultats intéressants mais irréguliers. Examinons d'abord les résultats en eau blanc d'œuf :

Avec un diamètre de 1 cm. 1/2, la hauteur minima de liquide nécessaire varie de 11 centimètres, ce qui donne des résultats bien inconstants, à 16 centimètres environ. Lorsque le tube de fibrine contient un culot de poudre de fibrine de 3 à 4 centimètres de hauteur, et que l'ensemencement est fait dans ce magma, on peut obtenir de très belles cultures avec une hauteur moindre; mais il s'agit alors de conditions spéciales, de cultures en morceaux d'organes, non de véritables cultures liquides. La culture en tubes d'Achalme fermés à des pressions variables constitue la mensuration de l'anaérobiose en gamme de pression : elle donne des résultats assez irréguliers. En général sur lait ou bouillon de 3 à 5 centimètres de hauteur, on obtient de belles cultures en 24 à 48 heures avec un vide de 60 centimètres. Les jours suivants, les tubes fermés avec un vide de 60 à 30 centimètres (pression de 16 à 46 centimètres) se développent progressivement. Avec une pression de 46 centimètres la culture met quelquefois 15 jours à être positive; souvent elle est peu abondante, et même peut rester histologique.

Si l'on compare les chiffres de mensuration d'anaérobiose du bacille du tétanos à ceux obtenus avec les bactéries précédentes, on remarque une identité presque complète; en tout cas, rien ne confirme l'opinion émise par les auteurs classiques d'une moindre exigence d'anaérobiose de ce germe : Vincent a simplement réalisé la culture en tube étroit. Quant au phénomène signalé par Sanchez Toledo et Veillon nous en avons donné la facile interprétation.

*
* *

De la mensuration de l'anaérobiose on passe aisément à l'aérobisation véritable du bacille du tétanos, qui s'obtient selon la technique générale que nous avons fixée.

Le procédé de la culture en tubes Liborius de gélatine donne des résultats tellement semblables à ceux déjà énoncés dans l'étude du vibron septique et du bacille d'Achalme, qu'il nous semble inutile d'y insister.

Par une série de cultures en tubes d'Achalme remplis de lait, de bouillon Martin, d'eau peptonée gélatine, fermés à des pressions croissantes, on arrive progressivement à cultiver le bacille du tétanos dans des tubes de culture ordinaire, tubes bas, à la pression atmosphérique. Le lait est digéré comme dans les cultures anaérobies.

De même les tubes de lait profonds de diamètre ordinaire ou étroits, sont utilisés pour des repiquages en gamme descendante de hauteur de liquide. En partant non de la culture de hauteur minima, mais d'une culture rapidement abondante, on repique tous les 4 à 5 jours des tubes dont le liquide a une hauteur décroissante de 1 à 2 centimètres. Ainsi on ensemeence souvent avec le tube initial lait 1 1/2-11, un deuxième tube, lait 1 1/2-10, puis un troisième, lait 1 1/2-9, etc.; si l'intensité de la culture s'arrête, on fait un repiquage sans diminuer la hauteur, ou même on revient à une hauteur légèrement plus élevée. En définitive, en 5 à 10 tubes, on obtient la culture vraiment aérobie avec digestion de la caséine; les tubes de gélose inclinée donnent de belles cultures, après ensemeencement avec les laits 1 1/2 diamètre, 3 hauteur.

Dans les séries décroissantes en bouillon ordinaire, souvent le microbe perdrait sa vitalité si on n'avait soin de redoubler les étapes, ou même au besoin, en cas de moindre richesse de la culture, de remonter pendant quelques passages la hauteur de la colonne de liquide.

La gamme décroissante d'eau peptonée-gélatine-glucose donne des résultats bien plus sûrs.

3° En somme avec des précautions, on arrive à obtenir la culture **sur gélose inclinée**. Les caractères en sont les suivants (voir fig. 8) :

Un ensemeencement à l'öse fait développer sur le trajet de la strie du fil quelques colonies arrondies de 2 à 6 millimètres environ de diamètre, sensiblement saillantes, régulières, humides et presque crémeuses. La couleur varie d'un blanc franc à une teinte un peu opaline légèrement bleutée ou teintée de gris. Souvent, en parti-

culier lorsque la culture est exposée à la lumière, la teinte devient jaunâtre, sans atteindre jamais la nuance du staphylocoque doré qu'elle rappelle atténuée. Le fil de platine s'en charge aisément au moindre contact, comme il fait d'une culture de bacille de Friedlander. Un ensemencement abondant donne sur gélose inclinée une nappe légèrement teintée en jaune ou presque opaline, rappelant fréquemment les cultures de bacille d'Eberth, aspect identique, malgré la richesse plus luxuriante de la culture aérobisée, à la culture anaérobie sur gélose inclinée ou sur pomme de terre (Vaillard et Vincent).

Sur les milieux sanglants et sur gélose hémoplasé, la culture paraît moins homogène; elle est parsemée de petites saillies arrondies qui se détachent sur le fond de la nappe; la teinte de la culture devient un peu plus foncée.

Sur lamelles, bacille court plus large que le bacille cultivé en anaérobie, rappelant comme dimensions le bacille d'Eberth et même le bacille court diphtérique, gramien, c'est-à-dire résistant à la décoloration par l'alcool après l'action de la liqueur de Gram, peu mobile, non sporogène, bien que les repiquages en eau blanc d'œuf sporulent abondamment. Dans les premiers tubes, on trouve soit uniquement, soit en quantité variable des filaments démesurés, des bacilles de forme irrégulière à renflement terminal, coudés, incurvés, massués, granuleux, sinueux, etc.

Cette asporulation, et cette richesse de formes d'involution dans les jeunes cultures aérobies sur gélose inclinée amène un rapprochement avec les résultats déjà cités plus haut de Vaillard et Vincent dans leurs essais de culture anaérobie sur pomme de terre. « Nous avons réussi, disaient-ils ¹, à obtenir la culture sur pomme de terre où le bacille du tétanos forme une couche humide luisante assez semblable à celle que donne le bacille typhique, composée de longs bâtonnets sans renflements ni spores. »

L'inoculation de repiquages de culture sur gélose inclinée en bouillon et lait donne aux animaux la toxhémie convulsive spécifique, légèrement atténuée ou au moins prolongée.

4° Le premier stade de l'aérobisation, stade d'intégrité biolo-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 6.

gique et chimique, dure environ jusqu'à la cinquième ou sixième culture sur gélose inclinée. Alors commence le deuxième stade : les cultures aérobies liquéfient tardivement, difficilement et incomplètement les cubes de blanc d'œuf ; le lait en apparence intact n'est digéré que le 5^e ou le 6^e jour ; la gélatine continue à se liquéfier rapidement. Bientôt le pouvoir tryptique tend à s'effacer ; mais alors les repiquages en milieux anaérobies peuvent encore, d'abord au premier, plus tard au deuxième ou troisième passages, retrouver leurs caractères primitifs et donner les cultures anaérobies de reconstitution. L'inoculation des cultures aérobies du deuxième stade tue les animaux d'une toxémie de moins en moins convulsive puis, en dernier lieu, d'une cachexie toxique, rappelant l'athrepsie.

Enfin survient le troisième stade. Le pouvoir tryptique a disparu, caséine et blanc d'œuf restent intacts même en culture anaérobie ; la gélatine pendant longtemps encore est transformée en une matière gommeuse, puis n'est plus digérée. Les animaux supportent alors 2 à 3 cc. de culture vivante ; ils accusent d'abord un amaigrissement notable, plus tard un malaise passager.

Le pouvoir pathogène spécifique a donc disparu bien avant la propriété de digérer la gélatine. Ce point n'est pas sans importance, car Vaillard et Vincent avaient vu (*Annales I. P.*, 91) que l'inoculation des cultures en gélatine âgées de 5 à 6 jours et non encore liquéfiées ne provoquaient aucun symptôme tétanique chez le cobaye et ils s'étaient demandé si la toxine et la diastase qui liquéfie la gélatine n'étaient pas une seule et même substance. Ils avaient d'ailleurs conclu à la non-identité, ce que nos expériences démontrent d'une façon indiscutable.

D'ailleurs le pouvoir pathogène subit comme le reste de la biologie du bacille du tétanos ces variations que nous signalons à chaque pas de son étude. Ainsi Vaillard et Vincent, dans leur mémoire des *Annales de l'Institut Pasteur* de 1891 (pages 8 et 9) écrivent : « Nous avons extrait des terres de surface par la culture des bacilles absolument identiques par leurs caractères morphologiques faisant comme lui des spores rondes et terminales, mais dépourvues de pouvoir pathogène. S'agirait-il de tétanos modifié par les agents cosmiques ? Cela nous a paru vraisemblable. Nous avons essayé de lui faire récupérer l'activité perdue sans y réussir jusqu'ici ».

Ce curieux fait biologique était à rapprocher de la perte progressive des caractères de différenciation, perte qui caractérise le 3^e stade.

La disparition du pouvoir sporogène, la diminution de la motilité, qui surviennent également au 3^e stade, continuent cette neutralisation du germe.

La perte du pouvoir sporogène du bacille de Nicolaïer peut se rapprocher de la perte inverse de la sporulation du bacille du charbon, qui ne sporule plus dès qu'on le prive légèrement d'oxygène. Elle est dans la biologie du bacille du tétanos un phénomène banal, ainsi que le démontrent les expériences de Vaillard et Vincent dans leur mémoire souvent cité (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1891). « Le bacille du tétanos croît même très rapidement à la température de 42 ou 43°. Mais alors la plupart des bacilles ne produisent plus de spores; ils apparaissent comme des bâtonnets granuleux et peu colorables, des filaments démesurément longs ou des bacilles présentant des formes renflées, arrondies en poires, en fuseau, etc., il ne s'est produit cependant aucune atténuation appréciable (Page 5) ».

La valeur de l'anaérobiose de reconstitution et de la sporulation aérobie est identique à la valeur des mêmes cultures de nos autres germes.

Le bacille du tétanos en anaérobiose de reconstitution fait retour au type anaérobiose initial. Signalons que dans un de nos essais, un tube de lait de 1 1/2 diamètre et 7 1/2 hauteur ensemencé avec des spores a donné une culture abondante. Nous sommes habitués à ces irrégularités biologiques du bacille de Nicolaïer.

La sporulation aérobie par contre, peut créer des races nouvelles. Ainsi un tube de sporulation aérobie de mai 1906 est repiqué sur différents milieux aérobies sans succès le 15 mai 1907. Mais un tube cacheté né de ce tube est repiqué positivement sur laits 1 1/2 diamètre, 8 hauteur, et 1 1/2 diamètre, 7 hauteur; bouillon gélatine 1 1/2 diamètre, 8 hauteur; eau fibrine 1 1/2 diamètre, 9 hauteur. Un tube de bouillon gélatine 1 1/2 diamètre 10 hauteur est resté négatif.

L'aérobiose avait donc été fixée par la sporulation.

5° Ainsi donc le bacille du tétanos se trouve dépouillé une à une

de toutes ses propriétés fermentatives, biologiques et pathogènes. A ce moment, il semblerait qu'il fût impossible de retrouver chez ce bacille neutre un point commun, une preuve d'identité avec le bacille anaérobie, dont nous l'avons fait dériver. Cette preuve existe; elle réside dans la conservation de l'agglutinabilité par le sérum antitétanique. Fait curieux, cette propriété biologique est la dernière à disparaître.

La perte du pouvoir agglutinatif du sérum mérite d'être précisée :

Le sérum de l'homme atteint de tétanos n'a, nous le rappelons, aucune propriété agglutinative sur le bacille; le sérum de cheval ou d'âne normal agglutine à 1 p. 100 ce microbe. Quant au sérum antitétanique, il agglutine à un taux qui atteint jusqu'à 1 pour 50000 (Macé, *Traité de Bactériologie*, 1901).

Au cours de l'aérobisation, nous allons assister à la disparition progressive de cette propriété spécifique; nous avons recours à la mensuration, procédé classique, pour étudier ce phénomène.

Nos expériences ont été faites en recherchant ce phénomène sur lamelles et dans les cultures, et en comparant l'action du sérum antitétanique et du sérum ordinaire. (Nous avons utilisé à son défaut du sérum antidiphthérique.)

Sur lamelles, les meilleurs résultats s'obtiennent en utilisant les cultures sur bouillon. Les cultures sur lait donnent des préparations peu nettes; de même l'émulsion dans du bouillon neuf d'une culture sur gélose se prête moins bien à de telles recherches.

La culture vivante doit être préférée à la culture formolée, qui perd assez rapidement ses réactions.

Voici quelques résultats. Le 15 mai 1907, nous recherchons l'agglutination d'une culture en bouillon de bacillogène âgée de 24 heures; le bouillon est trouble, avec un léger dépôt que l'agitation du tube fait disparaître.

L'examen de la culture au microscope révèle l'absence de tout amas. L'addition à une goutte de culture d'une goutte de sérum spécifique donne une agglutination massive immédiate avec amas occupant tout le champ du microscope. A un pour dix, agglutination en une demi-heure. En 2 heures, le mélange à 1 pour 400 donne encore d'abondants amas avec quelques bacilles libres. A 1/500 on ne constate plus que quelques amas tardifs.

Le taux de 1/400 supérieur au taux d'agglutination (1 p. 100) par

le sérum normal indique bien dans cette expérience la conservation de principes spécifiques dans la culture de bacillo-gène.

Les repiquages sériés en bouillon bas nous font assister à la diminution puis à la disparition du pouvoir agglutinatif. Lorsque le taux descend au-dessous de 1 p. 100, il reste, malgré cette diminution, plus élevé avec le sérum antitétanique qu'avec le sérum ordinaire.

Ainsi le 12 avril 1907, nous mesurons l'agglutinabilité d'une culture de bacillo-gène âgée de 4 jours. Sur lamelles, vérification préalable de l'absence d'amas. Voici les résultats :

Un mélange d'une goutte de culture et d'une goutte de sérum antidiphthérique donne un début d'agglutination immédiat et une agglutination nettement positive après un quart d'heure, quoique quelques bacilles restent libres. Au 1/10, même après 1 h. 15 tous les bacilles sont libres.

Au contraire, le mélange d'une goutte de culture à une goutte de sérum antitétanique donne une agglutination totale massive immédiate. Un mélange au 1/10 donne quelques amas après 30 minutes et agglutine totalement en 1 h. 10, contrairement au mélange à 1/10 étudié précédemment et fait avec le sérum antidiphthérique.

Le 18 avril 1907, une culture de 48 heures de bacillo-gène en bouillon bas donne une agglutination immédiate avec le sérum antitétanique, à parties égales. A 1/3 quelques amas apparaissent après 1 heure; à 1/10 résultat négatif.

Les cultures en bouillon bien développées, additionnées d'une quantité de sérum à une dose supérieure à la dose nécessaire pour l'agglutination s'éclaircissent tout d'abord pour redevenir rapidement troubles. Les tubes de bouillon additionnés de sérum antitétanique en forte proportion avant l'ensemencement donnent une culture d'abord en dépôt; mais rapidement la totalité du milieu se trouble.

On conçoit assez quelle est l'importance de ces expériences. Nous avons beau accumuler preuves et contrôles; il est toujours possible d'incriminer une cause d'erreur passée inaperçue. Mais à cette dernière expérience, une telle hypothèse s'évanouit. Il reste au bacillo-gène et au bacille une réaction commune, biologique et spécifique. Aucune argumentation ne saurait l'atteindre. Elle est la preuve de la rigueur de nos recherches sur l'aérobisation. Nous avons pu, plus haut, établir pour le vibron septique des faits identiques.

F. — VÉRIFICATION SUR D'AUTRES GERMES ANAÉROBES. UN TRAVAIL DE KITT

Il nous a semblé inutile de multiplier indéfiniment le nombre des germes étudiés. Toutefois nous avons pu vérifier la généralité des principes posés en cultivant en tube profond le bacillus botulinus, le staphylococcus parvulus, le bacillus ramosus, le putrificus de Bienstok, le germe anaérobie de Legros, etc.. Le bacille du charbon symptomatique, dont une culture nous a été fournie aimablement par le Prof. Vallée (d'Alfort), présente au point de vue biologique, dans son aérobisation, un intérêt notable : nous aurons l'occasion d'y revenir dans des recherches ultérieures.

D'ailleurs en Allemagne le Dr Kitt a fait sur ce point une intéressante tentative : il a vu se développer de très belles cultures de charbon symptomatique en se servant non pas de tubes à essai, mais de ballons contenant un 1/2 à un litre de bouillon, simplement obturés avec un tampon de coton et placés à l'étuve, comme pour obtenir une culture aérobie. L'expérience ne réussit pas toujours, mais en cas de succès, on obtient rapidement par repiquage du premier ou du deuxième ballon des cultures aérobies. *D'ailleurs l'auteur n'a pas obtenu de cultures sur pomme de terre ou sur gélose inclinée.* S'il note donc la conservation des fonctions biologiques du germe, il est certain qu'il n'a pas même atteint le premier stade complet de l'aérobisation.

Kitt a noté, comme nous, la nécessité pour réussir ces expériences de faire les réensemencements à la pipette avec une certaine quantité de virus et non au fil de platine.

TROISIÈME PARTIE

LES GRANDS FAITS BIOLOGIQUES NOUVEAUX DE L'AÉROBISATION

Un coup d'œil d'ensemble jeté sur les recherches que nous venons d'exposer en dégage un certain nombre de faits nouveaux qui éclairent la valeur de l'anaérobiose et précisent la conception de l'anaérobie pathogène.

A. — CRITIQUE DE L'HYPOTHÈSE D'UNE CONTAMINATION DES TUBES

Mais, tout d'abord, il nous faut revenir sur l'impossibilité absolue d'admettre dans nos recherches une erreur de technique. Cette impossibilité ressort de l'ensemble des précautions que nous avons prises pour la vérification de nos cultures et du caractère progressif et régulier des phénomènes observés. Examinons toutefois les principales causes d'erreurs que nous aurions pu rencontrer dans notre travail.

Sur la nature des germes étudiés, il ne peut y avoir aucun doute. Leur origine même, les vérifications morphologique, biologique et pathogène en répondent. Mais on peut supposer qu'une contamination de nos tubes s'est effectuée au cours de nos expériences.

Une impureté inaperçue peut se glisser dans les cultures; ne savons-nous pas que les plus rigoureux bactériologues ont quelquefois des tubes contaminés? Cette hypothèse devient insoutenable, dès qu'on l'étudie avec précision.

Soit une infection de nos tubes au début de l'étude d'un germe au moment de la mensuration de l'anaérobiose. Il faudrait d'abord supposer au microbe infectant une morphologie identique à celle du microbe primitif. Ce microbe infectant serait aérobie, car anaérobie il ne prouverait rien contre nos expériences : il faudrait admettre que seuls ont été contaminés les tubes d'une certaine hauteur ou d'une certaine pression. Quelle absurdité que de supposer une contamination élective et systématique des tubes de milieux liquides avec l'intégrité des tubes-contrôle de gélose ! Cette contamination élective et systématique devrait encore se répéter, identique à elle-même dans toutes les mensurations ! Supposons une contamination au 2^e stade : même absurdité. Si le tube de gélose inclinée contient une impureté, les repiquages de colonies isolées sélectionnent cette impureté, qui alors se transformerait après 5 passages en gélose, dans l'étude du vibron septique par exemple, en anaérobie dans les cultures de reconstitution !! Le passage du deuxième au troisième stade s'établit trop régulièrement, trop progressivement pour laisser admettre une contamination qui sauterait aux yeux par le développement en gélose inclinée de colonies de natures différentes !

En dernier lieu, l'agglutinabilité du bacillo-gène du tétanos, comme nous l'avons établi précédemment, permet en une minute de démontrer l'identité d'origine du bacille du tétanos et de son bacillo-gène.

De même, l'agglutinabilité du vibriogène septique par le sérum Leclainche-Morel ne laisse aucune discussion possible sur l'identité absolue du vibron septique et du vibriogène. Il serait absurde de ne pas reconnaître la valeur de cette démonstration. Nous pouvons donc, en toute sécurité, aborder l'énoncé des lois nouvelles.

B. — FIN DE LA SÉPARATION CLASSIQUE DES MICROBES EN AÉROBIES STRICTS MIXTES ET ANAÉROBIES STRICTS

Le fait principal définitivement établi est la disparition de la distinction posée par la bactériologie classique entre les aérobies et les anaérobies. La notion déjà ancienne et partout acceptée de

l'anaérobiose facultative d'un grand nombre d'aérobies avait amené la formation de trois groupements : aérobie, aéro-anaérobie ou anaérobies facultatifs, anaérobie exclusif. Si les aérobies étaient rapprochés des microbes mixtes, la séparation n'en restait pas moins absolue avec les anaérobies stricts.

Avant de rappeler comment nos recherches actuelles comblent le fossé de séparation, jetons un coup d'œil sur les recherches antérieures aux nôtres qui rendaient probable la destruction de toute barrière entre ces différents microbes.

*
* *

Quelques auteurs ont montré que certains germes aérobies pathogènes pouvaient au sortir de l'organisme humain infecté par eux ne pousser qu'à l'abri de l'oxygène (Gouget, Thiercelin, G. Rosenthal).

Nous avons dit que ces germes étaient devenus des *anaérobies temporaires*; rapidement ils se réhabituèrent à la vie en tubes de culture et reprenaient dès la deuxième ou troisième génération leur biologie ordinaire.

La thèse du docteur Legros nous donne (thèse de doctorat en médecine, 1902, p. 68) un argument intéressant sur le peu de valeur de la distinction en aérobies ou anaérobies. Dans l'eau vaseuse de la Seine, Legros trouve un bacille produisant par inoculation au cobaye une gangrène gazeuse nette. Ce bacille « est un bel exemple d'espèce **anaérobie de prédilection**; il ne cultive pas en surface sur milieux solides, mais peut cultiver et même être repiqué une ou deux fois en tube de bouillon ou d'eau peptonée glucosée.

« Sur les tubes de gélose inclinée, alors que l'ensemencement a été fait largement à la surface et dans l'eau de condensation, il pousse dans l'eau de condensation et parfois à la face profonde du bloc de gélose en donnant des bulles gazeuses. » Cette bactérie qui produit par inoculation pure la gangrène gazeuse est différente de la bactérie septique franchement aérobie, dont nous avons plus haut tracé le parallèle avec le Vibrion septique aérobisé.

Citons enfin ce passage du *Traité de Bactériologie* de Duclaux (t. I, p. 207) : « L'oxygène est un aliment comme un autre, pouvant être accepté ou refusé suivant les cas et qui n'a un rôle capital

qu'en ce qu'il est dans tous les cas une source de force dans son conflit avec les autres matières alimentaires ou avec une partie de la matière alimentaire qui le fournit. Le passage de la vie aérobie à la vie anaérobie, si manifeste chez les levures n'est qu'un témoignage nouveau de la plasticité du protoplasme chez certaines espèces, de la faculté qu'il possède de changer peu à peu dans la même cellule son mode d'alimentation. »

Dans un ordre d'idées inverse, nous avons établi également qu'aucune séparation ne pouvait être posée entre les aérobies exclusifs, et les microbes dits anaérobies facultatifs. A la Société de biologie (7 juillet 1906) nous avons donné la méthode d'adaptation à la vie sans oxygène libre des germes qui paraissent ne pouvoir s'en passer; elle consiste à reprendre la série de nos cultures en sens inverse, c'est-à-dire en colonnes de liquides de hauteur croissante et en tubes d'Achalme à pression décroissante.

L'aérophilie se mesure comme l'oxygénophobie, et l'anaérobisation s'obtient comme l'aérobisation. Appliquant cette méthode à l'étude du bacille du charbon, nous avons à la Société de l'internat des hôpitaux de Paris (26 juillet 1906), étudié le premier stade de l'anaérobisation de ce germe, stade semblable au premier stade de l'aérobisation des anaérobies puisqu'il est caractérisé par la conservation intégrale de toutes propriétés avec perte toutefois du pouvoir sporogène. Il est juste d'ajouter que le bacille du charbon perd avec grande facilité son pouvoir de sporulation, chaque fois que les conditions de culture sont défavorables.

Avant nous, Vincent dans des travaux cités plus loin à propos de l'acquisition du caractère pathogène, avait obtenu des cultures anaérobies peu vivaces de germes aérobies exclusifs.

*
* *

Nos recherches d'aérobisation des anaérobies comme celles d'anaérobisation des aérobies nous semblent de nature à établir définitivement combien est superficielle la division classique entre anaérobies et aérobies.

Avec elles nous apprenons que rien de fondamental ne sépare ces deux catégories de germes. Voici un microbe aérobie exclusif, le bacille du charbon; il est aisé d'arriver à le cultiver loin du

contact de l'air; il est aérophile; son aérophilie peut se mesurer, se restreindre, disparaître, et quand le bacille du charbon est devenu anaérobie, il n'a rien perdu de sa biologie.

Voici un anaérobie, le vibron septique; il est caractérisé par son impossibilité à tolérer le contact de l'air, mais aussi, par sa motilité spéciale, ses fermentations, son pouvoir pathogène. Nous le cultivons en tubes profonds ou en tubes d'Achalme à pressions variables et nous en faisons rapidement un microbe *identique à lui-même*, mais avec cette seule différence, qu'il est indifféremment aérobie ou anaérobie!

La notion nouvelle de la mensuration de l'anaérobiose montre assez que cette fonction n'est pas fondamentale. On la mesure avec précision, on la renforce, on la diminue, on la crée, on la détruit. Il est même des cas où nous ne savons si elle est présente ou absente.

Ne parlons pas ici de la mensuration de l'anaérobiose difficile et délicate en tubes d'Achalme. Laissons graviter la question autour de ce tube de culture dont l'unique caractère différentiel est sa hauteur de 22 centimètres et sa haute colonne liquide : c'est-à-dire le tube profond.

Il est en somme le tube universel; les anaérobies y croissent abondamment et les aérobies n'ont aucune raison de ne pas y pousser. Alors que dire de cette distinction fondamentale de la bactériologie qui disparaît lorsque au lieu d'utiliser des colonnes de liquide de 4 à 5 centimètres, on emploie simplement des tubes identiques, mais à colonne de liquide de 15 centimètres!

Notre tube étroit de même simplifie le problème. Que dire d'une division qui disparaît lorsque le diamètre des tubes employés passe de 1 cm. $1/2$ à un $1/2$ centimètre!

Nous pouvons donc poser notre première conclusion :

L'anaérobiose, loin d'être une fonction essentielle, est une fonction variable et mesurable :

La substitution à la culture en tubes bas des cultures en tubes profonds, c'est-à-dire en tubes contenant des colonnes liquides de 15 à 20 centimètres, et en tubes étroits, c'est-à-dire en tubes de un $1/2$ centimètre de diamètre, supprime toute séparation absolue entre les microbes aérobies et anaérobies.

C. — LES LOIS DE L'AÉROBISATION

Constance de la mensuration. Constance de l'évolution en trois étapes. Retour au type anaérobie de l'anaérobie de reconstitution. Création de races nouvelles par la sporulation aérobie. Perte du pouvoir pathogène et neutralisation du germe. — 1° Nous pouvons, après avoir établi cette première conclusion, passer aux faits généraux qui se dégagent de l'étude comparée des différents germes faite au point de vue de leur aérobisaiton. Or l'homogénéité des résultats est des plus remarquables. Souvent une expérience faite avec un germe ne diffère de celle faite avec le microbe suivant que par le nom du micro-organisme; et, dans l'exposé de nos recherches, nous avons dû écourter certains paragraphes, qui paraissaient n'être que la reproduction d'un paragraphe d'un chapitre antérieur.

Des tubes de 12 centimètres de hauteur avec un diamètre de 1 cm. 1/2 en lait profond; en eau peptonée gélatine, des tubes de 15 centimètres donnent d'excellents résultats aussi bien avec le bacille d'Achalme qu'avec le vibrion septique ou le bacille du tétanos, etc. Un vide de 40 à 50 centimètres de 10 minutes suffit à la culture initiale des anaérobies en tubes d'Achalme.

Cette similitude dans la mensuration de l'anaérobiose, nous la retrouvons dans la biologie de l'aérobisation. Bacille d'Achalme, vibrion septique, bacilles du tétanos, bacille gracile éthylogène s'aérobisent de la même façon.

L'aérobisation se fait soit en diminuant progressivement la hauteur de colonne du milieu liquide, c'est l'aérobisation en gamme descendante de profondeur, soit en augmentant progressivement la pression dans la culture en série de tubes d'Achalme, soit par délanolisation, soit par culture en gélatine, etc., elle est toujours facile à obtenir et identique à elle-même.

2° De même la biologie des germes aérobisés est calquée l'une sur l'autre. Vibrion septique, bacille d'Achalme, bacille du tétanos, etc., voient leur aérobisaiton évoluer en 3 phases.

Dans la première, le bacille reste lui-même; cette première étape est caractérisée par la conservation de toutes fonctions avec

toutefois une certaine atténuation du pouvoir pathogène qui reste spécifique. Mais dans la deuxième phase, nous assistons à un phénomène des plus curieux; la disparition progressive en cultures aérobies de tous les caractères distinctifs du microorganisme, l'intégrité et la conservation des fonctions dans les cultures anaérobies.

N'est-ce pas un fait impressionnant en biologie que cette orientation bilatérale de deux repiquages d'une même colonie? Si le fil de platine ou la pipette se porte sur un milieu aérobie, les ferments s'atténuent, le microbe cesse de digérer le blanc d'œuf, de coaguler le lait, de liquéfier la gélatine; le pouvoir de chimiotaxie négative disparaît, l'aérophilie s'accroît; mais si le même fil de platine ou la même pipette fécondent des milieux sans air, les cultures obtenues, sœurs des cultures neutralisées, gardent la différenciation chimique, fermentative et pathogène.

3° Quelle plus belle preuve de la puissance de l'adaptation au milieu que l'histoire de l'anaérobie de reconstitution! Voici un germe aérobisé du 2^e stade né du repiquage en série des germes les plus terribles; il est en train de devenir un germe neutre, indifférent, inoffensif, infermentogène! Eh bien, remettons-le en milieux anaérobies. Souvent d'emblée, quelquefois après quelques cultures, il renaît pour ainsi dire de lui-même et retrouve toute sa différenciation; car il avait dans son innocuité apparente, dans sa neutralité superficielle, gardé pour quelque temps encore la possibilité de revenir à sa différenciation puissante.

L'anaérobie de reconstitution, ainsi que nous l'avons dénommé, a fait retour au type anaérobie strict, tellement qu'il ne lui reste plus rien de son aérobisation passagère : il est revenu au degré d'anaérobiose primitif.

La troisième étape de la vie aérobie est caractérisée par la perte définitive des signes de différenciation. Ici plus de double voie : en culture aérobie, en culture anaérobie même en série, le germe neutralisé a perdu toute énergie; il n'est plus lui-même, il n'est plus capable de le redevenir. Le plus terrible des bacilles s'inocule par centimètres cubes sans impressionner l'animal réactif!

Même à ce moment, quelques faits de régénération par inoculation massive à l'animal montrent l'identité d'origine. L'innocuité

est d'abord une question de dose, le retour au type primitif une question de longue série d'anaérobiose!

Enfin et surtout la persistance en dernière ligne de l'agglutinabilité par les sérums spécifiques donne la preuve indéniable de l'absence de toute erreur!

4° L'anaérobie de reconstitution fait retour au type primitif; mais la sporulation aérobie fixe, encore qu'inconstamment, le microbe dans ses propriétés biologiques nouvellement acquises.

Si un bactériologue, non prévenu de ces faits, rencontrait dans ses recherches un microbe aérobie ayant le chimisme, la biologie d'un microbe anaérobie des mieux différenciés, il *conclurait certainement* à la disparité du microbe initial et de son dérivé aérobie. C'est à cause de cette création de races nouvelles que nous avons pu discuter la question si intéressante de l'identité ou de la non identité du vibrion septique et de la Bactérie septique aérobie. La création de races nouvelles fixées dans leur degré d'aérobisation est un des phénomènes les plus curieux de nos recherches.

5° Même dans les inoculations aux animaux, les expériences sont comparables d'un germe à l'autre. Une grande loi se dégage identique à celle de la perte des fonctions chimiques. Au cours de la vie aérobie, le pouvoir pathogène perd progressivement sa signature spécifique, tend à devenir banal pour disparaître en dernier lieu. Le bacille du tétanos donne d'abord la toxhémie convulsive spécifique, et le bacille d'Achalme son phlegmon gazeux; plus tard une toxhémie tardivement convulsive succède à l'inoculation du bacille de Nicolaïer; un abcès banal à pus louable, encore que très concret, va caractériser l'inoculation du bacillus perfringens en voie d'aérobisation.

Plus tard encore, vibrion septique, bacille d'Achalme, bacille du tétanos donneront lieu à ces cachexies mortelles, à ces amaigrissements athreptiques que Thiercelin a rapporté dans l'athrepsie infantile aux toxines de l'entérocoque (*Traité des maladies de l'enfance* du P^r Grancher, 2^e éd.). En dernier lieu, le bacillogène devient un microbe neutre et sans importance; son inoculation n'est suivie d'aucun phénomène.

Il n'est donc pas une fonction que l'aérobisation laisse aux microbes anaérobies. Au cours des 3 étapes nouvelles, le pouvoir pathogène s'atténue le premier, le chimisme diminue, se dissocie

et disparaît; la sporulation devient difficile et cesse de se produire, seule la morphologie persiste.

*
* *

La conservation primitive du pouvoir pathogène en culture profonde aérobie peut éclaircir, entre autres problèmes scientifiques, le rapport de la fonction anaérobie des microbes et des fermentations gangréneuses observées en pathologie, rapport discuté dans ces derniers temps.

Veillon et Zuber, et leurs élèves Guillemot, Rist, Hallé, etc. crurent pouvoir établir à la suite de leurs belles recherches sur les anaérobies que la gangrène des tissus était fonction du caractère anaérobie des germes pathogènes. Cette opinion fut d'abord admise; mais bientôt elle fut considérée comme trop exclusive, en particulier par MM. le P^r Roger et E. Weill qui publièrent dans la *Presse Médicale* (1901, n° 76, 21 septembre) un cas de gangrène bénigne des paupières due à un microcoque aérobie. Dans une étude de la broncho-pneumonie gangreneuse des pneumoconioses parue le 30 avril 1902 dans la *Presse médicale*, nous avons à ce sujet rappelé la première observation de notre thèse de doctorat en médecine (mai 1900). Cette observation a trait à un cas de broncho-pneumonie dont la formule bactérienne consiste en un diplocoque aérobie associé à un bacille anaérobie. Ainsi la présence dans un foyer pulmonaire d'un bacille anaérobie n'entraîne pas nécessairement la déchéance gangréneuse de ce territoire. Lorsque Legros par l'étude de la bactérie septique aérobie eut démontré définitivement l'existence de gangrènes due à un microbe aérobie, on put conclure que la loi de Veillon-Zuber ne pouvait plus être considérée comme absolue. Elle reste pourtant vraie dans la plupart des cas.

Nos expériences apportent à la pathogénie des gangrènes une nouvelle contribution. Les microbes étudiés par Veillon comme le *Bacillus perfringens* ne sont pas gangréneux en tant qu'anaérobies; car ils cessent d'être anaérobies tout en restant gangrénigènes. Il semble même que leur pouvoir pathogène soit différent des fonctions chimiques; car ils cessent d'être gangrénigènes avant de perdre leur pouvoir fermentatif.

*
* *

De l'émasculatation progressive et régulière de ces bacilles justement redoutés pour la constance de leurs effets et dont la virulence semblait faire partie intégrante, il faut rapprocher, au point de vue de la biologie générale, les recherches de Charrin et de Nittis qui rendirent le bacillus subtilis virulent, et celles de Vincent qui a étudié dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (1898) les « Aptitudes pathogènes de certains saprophytes ». Nos recherches forment la contre-partie de ces travaux :

Charrin et de Nittis pour exalter le subtilis employèrent trois procédés : culture sur des bouillons de plus en plus riches en sang ; passages au travers de l'animal ; éducation sur des milieux artificiels de plus en plus riches en certains poisons diastasiques, comme la toxine diphtérique. Ils obtiennent par les deux premiers procédés, surtout grâce à l'injection massive à l'animal et à la sélection des espèces une race capable de tuer en moins de 24 heures avec des quantités peu considérables, apte à fabriquer des produits solubles les uns mortels, les autres vaccinaux. La maladie reste bactériologiquement locale. Ils concluent que la distinction des microbes en pathogènes et non pathogènes est tout à fait artificielle. Les expériences de Vincent mènent à une conclusion identique, en même temps qu'elles établissent antérieurement à nos recherches la possibilité d'anaérobiser des aérobies. Il cultive en sacs de collodion intra-abdominaux les saprophytes aérobies ; mais il insiste sur la nécessité de donner aux sacs des parois épaisses, et d'y laisser une certaine quantité d'air. A ces conditions indispensables pour l'expérimentation avec le bacille *Mégaterium* s'ajoute pour le *bacillus mesentericus vulgaris* la nécessité d'agiter le sac de collodion avant l'ensemencement. Au 6^e passage en sac de collodion le microbe a acquis une virulence considérable, puisque 2 gouttes injectées sous la peau de la souris la tuent avec des lésions de péricardite et de pleurésie hémorragique et une septicémie considérable. Fait important par comparaison avec nos recherches « en même temps que le bacille megaterium acquérait de la virulence, on constatait un changement manifeste dans les caractères de ses cultures ». Au lieu d'un voile surmontant le bouillon presque clair, on obtenait des bouillons uniformément troubles ; il semblait s'être adapté aux nouvelles conditions d'anaérobiose relative réalisées par la culture en sac de collodion.

Le bacillus mesentericus vulgatus au 7^e passage en sac de collodion tue la souris blanche en moins de 12 heures à la dose de 8 gouttes. Un lapin de 2,530 grammes mourut en 30 heures à la suite de l'injection intraveineuse de 1 cc. d'une culture au 8^e passage en sac. Parallèlement à ces variations biologiques, le bacille modifie considérablement les caractères de culture. Au lieu de former à la surface du bouillon un voile dense épais qui envahit la surface interne du verre, on trouve une culture uniquement trouble avec un voile délicat. Examinée après 15 jours la culture est remarquablement pauvre en spores. Enfin sur gélose et sur pomme de terre, le bacille forme une strie opalescente rappelant celle du bacille d'Eberth.

Il nous faut citer en entier le dernier paragraphe qui constate l'adaptation complète à la vie anaérobie, coïncidant avec l'acquisition de propriétés pathogènes :

« Il n'est pas jusqu'à l'un de ces attributs les plus importants et en apparence les plus immuables, à savoir son caractère strictement et essentiellement aérobie, dont notre bacille ne puisse dans une certaine mesure, se dépouiller à son tour.

Malgré son avidité pour l'oxygène, le microbe s'est lentement habitué à vivre dans l'abdomen des animaux, dans des conditions d'oxygénation beaucoup moins favorables. Si avant de fermer la culture en sac et de la mettre dans le péritoine, on additionne le milieu d'un peu de sulfo-indigotate de soude et qu'on retire le sac déjà après 48 heures, on constate que l'indigo a été totalement réduit. Les cultures en sac dégagent une odeur particulière caséuse analogue à celle des anaérobies et que n'ont pas les cultures faites à l'air libre. Il y a plus : en cultivant in vitro et dans le vide fourni par la pompe à mercure le bacille retiré du sac, on s'aperçoit qu'il s'y développe, quoique très faiblement, alors qu'un échantillon témoin primitif ne donne lieu à aucune culture. Le bacille modifié trouble le bouillon dans ces nouvelles conditions et réduit l'indigo. La culture anaérobie examinée au microscope montre des bacilles normaux, sans spores, sans formes d'involution. Il y a donc eu véritablement culture dans le vide d'un microbe exclusivement aérobie. Ces essais ont été poursuivis; mais à la deuxième génération, la culture était devenue beaucoup plus faible, et la troisième génération fut nulle ¹. »

1. Il y a loin de ces faits à la méthode générale de transformation des aérobies en anaérobies facultatifs que nous avons formulée, et qui nous a guidé dans l'étude de l'anaérobisation du bacille du charbon.

D. — L'ALLOBISME; MÉTHODE D'IMMUNISATION

L'application de la diminution progressive du rôle pathogène nous a permis de jeter les bases de l'allobisme, méthode d'immunisation et de vaccination contre les microbes anaérobies.

Dans nos expériences il faut distinguer l'immunisation allobique obtenue par inoculation de toxines et la vaccination allobique obtenue par inoculation de cultures d'abord atténuées puis virulentes. Souvent l'immunisation allobique sera le premier temps de l'allobi-vaccination. L'allobi-sérothérapie devra être recherchée par les injections de sérum d'animaux allobi-immunisés ou allobi-vaccinés : l'asepsie du sérum sera, dans ce dernier cas, surveillée attentivement.

Dans notre note à la Société de Biologie nous écrivions (séance du 28 juillet 1906) : « Il nous a paru désirable de simplifier autant que possible la méthode et d'aboutir à une technique simple et pratique. Aussi avons-nous rejeté comme difficileux le procédé qui découlait le plus naturellement de nos recherches et qui consistait à injecter aux animaux successivement des cultures aérobisées du 3^e, du 2^e et du 1^{er} stade, enfin des cultures anaérobies. Ce procédé d'ailleurs très bon nécessite l'obtention longue et relativement délicate de cultures du 3^e stade. Parallèlement dans l'allobi-immunisation nous avons utilisé l'injection successive de cultures filtrées ou mortes ou bouillies des 3 stades, procédés que nous ne recommandons pas, puisqu'il est possible d'être plus simple. » Nous aurons à montrer prochainement l'utilité de l'emploi de cette technique un peu difficileuse.

Mais en général les immunisations et vaccinations allobiques utilisent les cultures en lait et bouillon, dont la colonne liquide a une hauteur de 4 à 7 centimètres, et dont le chimisme est conservé, plus tard les cultures initiales en lait et en bouillon profond, c'est-à-dire les premiers repiquages en tubes profonds de cultures anaérobies. Dans les différents cas, on passe de l'injection de la culture filtrée dans le vide, à la culture stérilisée au formol, mais injectée sans filtration, de manière à injecter les corps microbiens et les toxines; puis à la culture vieillie vivante; enfin à la culture

vivante de 4 à 8 jours. Il faut se souvenir que les cultures en bouillon sont beaucoup moins virulentes et moins toxiques que les cultures sur lait. Les inoculations vont en général de 1 à 5 cc., elles sont faites de 4 en 4, ou de 8 en 8 jours. Aucune nouvelle inoculation ne sera faite sans avoir vérifié le poids de l'animal qui ne doit pas avoir diminué entre deux inoculations. Pour faire tolérer l'injection, il est souvent utile d'injecter en même temps que la culture 2 à 5 cc. de liqueur de Gram, ou 2 à 10 cc. d'iodipine.

Il faut éviter dans ces manifestations l'emploi de cultures sporulées; donc les cultures en eau blanc d'œuf non filtrées ne seront pas utilisées.

Nous avons donné avec l'étude du vibron septique, une progression de vaccination de cobaye. Nos recherches sur la vaccination contre le bacille du tétanos et le bacille d'Achalme seront publiées dans un travail ultérieur — nous ne voulons les donner qu'après avoir étudié leurs conséquences médicales — elles ne seraient pas à leur place dans un ouvrage de pure biologie.

E. — BACILLES ET BACILLOGÈNES.

Hypothèses sur l'origine des microbes anaérobies pathogènes. — 1° Si le hasard des études bactériologiques faisait rencontrer au cours de recherches un bacille anaérobie et son bacillo-gène, c'est-à-dire son dérivé aérobie neutralisé, privé de toutes ses fonctions, l'étude de ces deux germes ferait conclure à leur nécessaire séparation. Rien ne les rapproche que leurs caractères histologiques; le bacillo-gène ne peut plus remonter au type différencié, et des manipulations longues sont indispensables pour passer du bacille au bacillo-gène. Quelle est du bacille ou du bacillo-gène la forme primitive? A vrai dire, l'expérimentation nous fait rencontrer le bacille et non le bacillo-gène et passer du bacille au bacillo-gène, et non vice-versa. Néanmoins, de la comparaison et de l'étude de ces deux variétés est née dans notre esprit cette hypothèse que le bacillo-gène est le microorganisme initial et que le bacille est un microorganisme transformé et différencié par adaptation à la vie parasitaire.

La nature va du simple au complexe, et non du complexe au simple. Un germe parasitaire ne saurait primitivement exister, il ne peut être qu'une forme d'adaptation au cours de l'évolution des êtres organisés. Le bacillogène, micro-organisme indifférent, s'est trouvé par le hasard des conditions d'existence des animaux, transporté dans un organisme supérieur; en s'y développant, il a acquis pour assurer son existence des fonctions nouvelles qui se sont sélectionnées, et qui grâce à la sporulation sont devenues définitives. Ainsi est né le bacille, ainsi peut-être, continue à se faire la transformation incessante de micro-organismes libres et indifférents en bactéries parasites et pathogènes.

2° Faut-il en présence de ces phénomènes prononcer le nom de transformisme microbien? La question doit être réservée. Car si en faveur de cette théorie, on invoque la métamorphose complète qui accompagne l'aérobisation du germe et l'incapacité absolue pour le bacillogène de revenir à un moment donné au type bacille, il est facile de répondre que le bacillogène porte, malgré sa neutralisation, en lui-même la direction de sa différenciation. Un bacillogène tétanique, tant qu'il peut faire retour au type anaérobie, redonne un bacille du tétanos; notre méthode permet toujours de passer du vibron au vibriogène, etc. Quant à quelques faits rares, semblables à ceux que nous avons signalés à la fin de l'étude du bacille d'Achalme, nous ne les avons pas reproduits systématiquement. Dans ces conditions, nous préférons les considérer uniquement comme une indication de nouvelles recherches ¹.

1. Depuis la rédaction de ce mémoire, nous avons pu, avec la collaboration de notre maître et ami Thiroloix, découvrir et étudier la transformation du bacille du rhumatisme articulaire aigu en entérocoque (*Société médicale des hôpitaux*, octobre 1907).

CONCLUSIONS

Nous désirons résumer les points essentiels de nos recherches sous forme de conclusions.

1° La culture des microbes anaérobies doit se faire en tubes Liborius-Veillon, tube de séparation (cette séparation devenant facile à effectuer avec la *manœuvre de la boîte de Petri*); en tubes d'Achalme, tube de conservation; et dans *notre tube cacheté*, tube d'étude et de recherche, qui supprime les difficultés inhérentes aux techniques antérieures. Les tubes cachetés étranglés, le ballon cacheté seront employés dans la culture des anaérobies gazogènes.

2° Tous les microbes anaérobies cultivent en *tubes profonds*, c'est-à-dire dans des tubes de diamètre ordinaire, mais dont les grandes dimensions permettent au milieu liquide d'atteindre une hauteur de 12 à 18 centimètres. La hauteur de liquide nécessaire à la culture est en rapport inverse avec la largeur des tubes (principe du tube étroit). L'anaérobiose est une fonction variable susceptible de mensuration. Cette mensuration se fait par desensemencements dans des tubes remplis de colonnes de liquide de hauteur variable, et dans des tubes d'Achalme fermés à différentes pressions.

3° L'aérobisation, c'est-à-dire l'adaptation à la vie aérobie, s'obtient par la délanolisation des tubes cachetés, par le vieillissement des cultures en gélatine Liborius des anaérobies liquéfiantes, surtout par la culture en gamme ascendante de pression sur tubes d'Achalme et en gamme descendante de hauteur en tubes profonds.

4° Les microbes anaérobies évoluent vers l'aérobisation en trois étapes; la première d'intégrité des fonctions biologiques, chimiques et pathogènes; la deuxième de perte progressive de ces propriétés en milieux aérobie avec possibilité de retour en milieux

anaérobies; la troisième de perte définitive de ces propriétés. La fonction gangrénigène n'est pas liée à l'anaérobiose.

5° La perte progressive de virulence permet d'obtenir l'immunisation et la vaccination des animaux. On utilisera soit la culture en tube profond, soit la culture du 3^e stade.

6° Le bacille d'Achalme, le vibron septique, le bacille gracile éthylogène, le bacille du tétanos présentent dans leur aéro-bisation un grand nombre de faits communs ou spéciaux, précisés dans leur étude.

Le bacille du charbon symptomatique, le bacillus putrificus de Bienstock, le staphylococcus parvulus, le bacillus ramosus de Veillon obéissent aux lois générales de l'aéro-bisation.

7° La sporulation des cultures aéro-bisées donne naissance à des races nouvelles, les aéro-vibrions septiques, aéro-bacilles du tétanos, etc.; les anaérobies de reconstitution font retour au type primitif.

8° Le bacille dépouillé de ses propriétés différentielles devient un bacillo-gène. Les bacillo-gènes sont probablement la source originelle des bacilles; le microbe parasite n'étant que l'adaptation différenciée d'un micro-organisme neutre primitivement indépendant.

9° La théorie du transformisme microbien trouverait un argument dans l'impossibilité de faire faire au bacillo-gène retour au type bacille, mais on peut toujours passer du bacille au bacillo-gène. Quelques faits partiels observés mais non reproduits systématiquement nous font simplement considérer comme probable le transformisme microbien; ils appellent d'autres recherches voir la note p. 91).

APPENDICE

Sur un mémoire de M. le Dr Georges Rosenthal, *sur l'adaptation à la vie aérienne (aérobisation) des microbes anaérobies stricts*,

Par M. FERNAND WIDAL, *rapporteur* ¹.

M. le Dr Georges Rosenthal, chef de clinique à la Faculté de médecine, a présenté à l'Académie un mémoire basé sur des recherches qui remontent à 1902 et qui l'ont amené à formuler une méthode générale d'adaptation à la vie aérienne (aérobisation) des anaérobies stricts et à décrire des lois générales d'évolution de ces germes aérobies.

I. — Pour étudier la biologie des microbes anaérobies, il fallait tout d'abord trouver un procédé de culture en milieux liquides qui fût d'un maniement simple tout en étant d'une technique absolument rigoureuse. M. Rosenthal a réalisé ce procédé en employant le *tube cacheté*, c'est-à-dire un tube ordinaire de culture dont le milieu liquide est surmonté d'un anneau de lanoline haut d'un demi-centimètre. Ce tube se stérilise à l'autoclave à 120 degrés comme les milieux ordinaires. Comme la lanoline fond à 42 degrés, il est facile, avant de s'en servir, de fondre avec le brûleur du bec Bunsen la bague protectrice sans abîmer la culture. Les manipulations se font avec le tube cacheté aussi aisément qu'avec un tube de bouillon ordinaire ; il faut simplement substituer à l'öse de platine des pipettes ordinaires. Remis à l'étuve, le tube se recachète au-dessous de 41 degrés.

Pour les anaérobies dont la culture dégage une grande quantité de gaz, M. Rosenthal a employé le *tube cacheté étranglé*, tube cacheté dont la lanoline occupe une partie rétrécie. Le dégagement des gaz repousse alors la lanoline dans la partie de calibre normal du tube et un chauffage du bec Bunsen reconstitue le lendemain le tube cacheté.

L'auteur a vérifié l'imperméabilité de l'anneau de lanoline aux substances chimiques et aux gaz. Les diverses manipulations faites avec

1. Académie de médecine, séance du 30 juillet 1907.

les cultures obtenues l'ont amené à une constatation importante. Il a vu que tous les anaérobies stricts poussaient en *tubes profonds*, c'est-à-dire dans des tubes de 18 à 25 centimètres de hauteur, remplis d'une colonne de liquide de 12 à 18 centimètres. L'importance de la hauteur de la colonne de liquide a engagé M. Rosenthal à étudier la valeur du diamètre des tubes. Il a décrit alors le *tube étroit*, simple tube de culture ayant la hauteur ordinaire du tube à essai, mais ayant un diamètre variant de un quart de centimètre à un centimètre. La culture des anaérobies y est d'autant plus facile que le diamètre est plus petit.

Dans les expériences en tubes profonds, l'auteur a éliminé l'emploi du lait ordinaire, dont la crème fait artificiellement un tube cacheté, et il a employé le lait écrémé, le bouillon ordinaire, le bouillon Martin, l'eau peptonée-gélatinée, l'eau distillée contenant en suspension des cubes de blanc d'œuf ou de la fibrine.

Pour réussir les expériences qui suivent, il importe de faire les repiquages avec une pipette chargée de 7 à 10 gouttes d'une culture mère en plein développement.

De l'étude du tube profond découle la *Mensuration de l'anaérobiose*. Il était naturel, en effet, de chercher la hauteur de colonne de liquide utile pour le développement des différents anaérobies. Cette hauteur varie de 9 centimètres (chiffre faible) à 15 centimètres pour les tubes ayant un diamètre de 1 centimètre et demi. Le lait demande 9 à 12, le bouillon gélatiné 12 à 15. Pour donner plus de précision à ses recherches, M. Rosenthal a fait des essais de cultures anaérobies en *tubes d'Achalme*, c'est à-dire en tubes fermés à la lampe après aspiration de l'air par la trompe à eau, mais en ayant soin de soumettre les tubes à des vides déterminés au manomètre.

De ces deux procédés de mensuration de l'anaérobiose, il était logique et simple de passer à *l'aérobisation des anaérobies*; l'auteur y est aisément arrivé en employant de multiples procédés. Les principaux sont :

1° *L'aérobisation par culture en gamme ascendante de pression*, c'est-à-dire le repiquage en série des cultures dans des tubes fermés à une pression de plus en plus forte, de façon à passer de la pression de 30 centimètres facilement supportée à la pression de 35 à 40 centimètres, etc., jusqu'à 765 millimètres;

2° *L'aérobisation par cultures en tubes profonds à colonne de liquide progressivement descendante*, procédé le plus simple et le plus facile à reproduire. Il consiste à repiquer de 5 à 5 jours les cultures bien développées dans des tubes profonds en diminuant chaque fois de 1 centimètre la hauteur de la colonne liquide. On arrive ainsi en 10 tubes à cultiver un anaérobie strict en lait 1 1/2,3 c'est-à-dire en tube de 1 cm. 1/2 de diamètre et 3 centimètres de colonne liquide;

3° *L'aérobisation par délanolisation et vieillissement*. Ce procédé consiste à aspirer à la pipette la bague de lanoline fondue, après plein développement de la culture, et à laisser se faire l'adaptation à l'air.

4° *L'aérobisation par cultures en tubes Liborius en gélatine des anaérobies liquéfiantes.* — Ce procédé consiste à utiliser l'adaptation spontanée à l'air dans les tubes de gélatine digérée par le micro-organisme. Lorsque la culture est encore vivante après 30 ou 40 jours, elle est souvent aérobisée.

Lorsque la culture est devenue abondante dans les tubes liquides ordinaires, on peut obtenir sur gélose inclinée des cultures de différents anaérobies. Ces cultures s'obtiennent soit par repiquage des tubes de lait, soit seulement par repiquage des tubes bas de bouillon.

L'étude biologique de l'aérobisation a conduit M. Rosenthal aux règles suivantes :

L'anaérobie adaptée à la vie aérobie évolue en trois étapes. La *première, de conservation* intégrale des fonctions chimiques, biologiques et pathogènes ; la *deuxième, de disparition progressive* des fonctions en culture aérobie, avec possibilité de régénération de toutes fonctions dans les tubes anaérobies ; la *troisième, de perte définitive* de toutes fonctions en tubes aérobie ou anaérobies.

Dans la première étape, le pouvoir pathogène subit rapidement une sensible diminution ; si bien que la dose mortelle de culture est augmentée, ou que l'action est plus lente. La première étape dure jusqu'à l'obtention des cultures en gélose inclinée. La deuxième étape succède progressivement à la première ; les ferments sont de moins en moins actifs ; leur atténuation est simultanée ; toutefois la liquéfaction de la gélatine dure plus longtemps que les autres fonctions chimiques.

L'auteur dénomme *anaérobie de reconstitution* le repiquage en anaérobie d'une culture aérobie en train de perdre ses fonctions de différenciation. L'anaérobie de reconstitution fait retour au type initial et perd entièrement son adaptation à la vie aérienne.

La troisième étape, ou étape de neutralité, nous montre un germe devenu inoffensif quelle que soit la puissance initiale du pouvoir pathogène, et privé de toute action fermentative. Le *bacille est devenu le bacillo-gène*.

L'identité des bacille et bacillo-gène est démontrée par la conservation des propriétés agglutinantes des sérums thérapeutiques (antitétanique et antiseptico-émiq).

A la première étape, la *sporulation aérobie* fixe l'adaptation à la vie aérienne au point obtenu et permet l'obtention des races nouvelles ; se sont les *aérobacilles* et *aérovibrions*.

Grâce à la variation progressive du pouvoir pathogène et à sa disparition, M. Rosenthal pense pouvoir formuler les principes de nouvelles méthodes d'immunisation et de vaccination des animaux contre les anaérobies. Il emploie soit l'injection répétée de doses croissantes de bacillo-gène, soit l'inoculation de cultures en tubes profonds formolés, soit l'injection de toxines et de cultures filtrées à la bougie dans le vide.

II. — Les expériences de l'auteur ont porté sur le bacille d'Achalme, sur le vibrion septique, le bacille gracile éthylogène, et le bacille du tétanos, que l'auteur a étudié complètement à ce point de vue. M. Rosenthal a simplement vérifié l'exactitude des lois nouvelles avec le bacillus botulinus, le bacillus ramosus, le bacille du charbon symptomatique, le staphylococcus, parvulus, etc.

Les microbes d'étude ont été choisis à cause de leur haute différenciation biologique et de la facilité du contrôle née de cette complexité même.

Le *bacille d'Achalme* pousse en vingt-quatre heures dans des tubes de lait contenant une hauteur de liquide de 5 centimètres à une pression de 30 centimètres, et il se développe en tubes profonds de 1 cm. $1/2$ de diamètre à partir d'une hauteur de 9 centimètres. La culture sur gélose inclinée est difficile à obtenir.

Injecté aux animaux, il les tue au premier stade de toxémie avec phlegmon gazeux au point d'inoculation; les cachectise ou les tue, au deuxième stade, avec production d'abcès à pus louable; les cachectise légèrement au troisième. M. Rosenthal espère obtenir bientôt la vaccination du cobaye et du lapin.

Le *vibrion septique* se développe facilement sous un vide de 40 centimètres, et dans des tubes profonds de lait ayant 1 cm. $1/2$ de diamètre, et 10 centimètres de hauteur. Aérobisé, il donne facilement sur gélose inclinée de belles nappes homogènes bleutées et des colonies opalines ayant 1 à 3 millimètres de diamètre. La sporulation de ces cultures aérobies amène la formation de races nouvelles, de véritables bactéries septiques aérobies analogues à la bactérie septique aérobie de Legros.

L'injection au cobaye de doses croissantes de cultures en lait profond produit aisément la vaccination de cet animal. Privé de toutes ces propriétés, le vibriogène septique conserve la faculté d'être agglutiné longtemps encore par le sérum antiseptécémique de Leclainche.

Le *bacille gracile éthylogène* (Achalme et G. Rosenthal) est un microbe anaérobie de l'estomac qui produit la fermentation alcoolique du lait; il s'aérobise facilement, mais perd dans ce cas sa vitalité.

Le *bacille du tétanos* obéit aux lois de l'aérobisation, mais il a des réactions irrégulières et présente souvent des faits d'aérobisation déréglée ou irrégulière. Il se développe en lait profond de 1 cm. $1/2$ de diamètre et 9 à 10 centimètres de hauteur, et supporte en tube d'Achalme une pression de 30 centimètres. Il donne sur gélose inclinée des colonies abondantes, en nappe opaline, ou blanchâtre, qui, à l'air, prennent une teinte légèrement jaunâtre. Lorsque le bacille du tétanos, entièrement dépouillé de ses fonctions, est devenu le bacillo-gène, il garde encore la propriété spécifique d'être agglutiné par le sérum antitétanique. Rien ne semble plus intéressant que de voir à ce moment le lapin supporter sans réaction des inoculations

de 3 à 5 centimètres cubes de culture vivante : c'est là une des bases des recherches de l'auteur concernant la vaccination.

M. Rosenthal a pu, en renversant la marche de ses expériences, adapter systématiquement les aérobies stricts à la vie anaérobie; il a étudié à ce point de vue le *bacillus anthracis*, qui, au premier stade de l'anaérobisation, perd uniquement son pouvoir sporogène.

Tel est l'ensemble de recherches que l'auteur a présenté à l'Académie de médecine. L'aérobisation semble donc supprimer la barrière mise entre les aérobies stricts, les anaérobies facultatifs et les anaérobies stricts.

Souhaitons que les recherches commencées par M. Rosenthal, en utilisant les modifications fonctionnelles ainsi obtenues par l'aérobisation, le conduisent, comme il l'espère, à des procédés nouveaux d'immunisation et de vaccination.

Des remerciements sont dus à M. Rosenthal pour son intéressant travail. Je propose à l'Académie de les lui adresser.

— Les conclusions du présent rapport, mises aux voix, sont adoptées.

NOTES

présentées aux différentes Sociétés
ayant servi à la rédaction de ce Mémoire.

1. — SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE

- 2 nov. 1901. — Séparation des microbes anaérobies cultivés en tubes de Liborius par le procédé de la boîte de Pétri.
- 18 oct. 1902. — Culture extemporanée des anaérobies en milieux liquides : le tube cacheté.
- 17 janv. 1903. — Expériences de contrôle du tube cacheté.
- 7 nov. 1903. — Transformation des microbes anaérobies en aérobies.
- 4 juin 1904. — Culture des anaérobies gazogènes en tubes cachetés étranglés.
- 12 mai 1906. — Culture aérobie du bacille d'Achalme : Mensuration de l'anaérobiose.
- 19 mai 1906. — Les trois étapes de l'évolution aérobie du bacille d'Achalme.
- 26 mai 1906. — Culture aérobie du vibrion septique : Mensuration de l'anaérobiose.
- 2 juin 1906. — Les trois étapes de la vie aérobie du vibrion septique. Principe de l'allobi-immunisation.
- 16 juin 1906. — Le bacille gracile éthylogène, microbe anaérobie de l'estomac (avec Achalme).
- 30 juin 1906. — Adaptation à la vie aérobie du bacille gracile éthylogène.
- 7 juillet 1906. — Transformation progressive des microbes aérobies stricts en anaérobies facultatifs.
- 28 juillet 1906. — L'allobisme, méthode d'immunisation et de vaccination contre les microbes anaérobies : allobivaccination du cobaye contre le vibrion septique.
- 27 oct. 1906. — La culture en culot de gélatine des anaérobies liquéfiant, nouveau procédé d'aérobisation.
- 17 nov. 1906. — Le tube étroit, nouveau procédé de culture des microbes dits à tort anaérobies stricts.
- 16 mars 1907. — Mensuration de l'anaérobiose et aérobisation du bacille du tétanos.

- 13 avril 1907. — Les trois étapes de la vie aérobie du bacille du tétanos. Bacille et bacillogène du tétanos.
- 4 mai 1907. — L'agglutinabilité du bacillogène du tétanos, dernier vestige de sa parenté avec le bacille du tétanos.
- 1^{er} juin 1907. — Retour au type initial de l'anaérobie de reconstitution.
- 8 juin 1907. — La sporulation aérobie crée des races nouvelles : aérovibrions et aérobacilles.
- 15 juin 1907. — L'agglutinabilité du vibriogène septique par le sérum de Leclainche-Morel, dernier vestige de sa parenté avec le vibrion septique.

II. — SOCIÉTÉ DE L'INTERNAT DES HOPITAUX.

- Juillet 1906. — L'anaérobisation du bacille du charbon. Etude du premier stade.
- Novembre 1906. — L'aérobisation des anaérobies stricts liquéfiant étudiée dans les cultures en gélatine. Dissociation de la perte du chimisme.

III. — ACADÉMIE DE MÉDECINE.

- Juillet 1907. — L'aérobisation des anaérobies (voir ci-joint le rapport de M. le Prof. ag. Fernand Widal (séance du 30 juillet).

EXPLICATION DES FIGURES

PLANCHE I

FIG. I. — Tube de Liborius-Veillon (hauteur minimum de gélose).

FIG. II. — Tubes et ballons cachetés : — *a*, tube eau blanc d'œuf cacheté ; — *a'*, tube bouillon cacheté ; — *b*, tube cacheté étranglé ; — *c*, ballon cacheté ; — *d*, ballon cacheté étranglé.

FIG. III. — Préparation du tube d'Achalme : *a*, premier étranglement ; — *b*, deuxième étranglement ; — *c*, le tube effectué.

FIG. IV. — La Mensuration de l'Anaérobiose : — En I, robinet de réglage. Sa manœuvre permettra d'obtenir la pression désirée ; — En II, robinet externe d'adaptation du caoutchouc plein. La figure représente un tube achalmisé prêt à être fermé par un bec Bunsen qu'on mettra au-dessous de l'étranglement.

FIG. V. — *a*, type de tube profond, tube universel où poussent aérobies et anaérobies ; — *b* et *c*, tubes étroits.

PLANCHE II

FIG. VI. — Culture sur gélose inclinée de bacillus perfringens.

FIG. VII. — *a*, Culture en nappe homogène sur gélose inclinée de vibron septique ; — *b*, culture de vibron septique en stries.

FIG. VIII. — Culture aérobie du bacille du Tétanos.

PLANCHE I

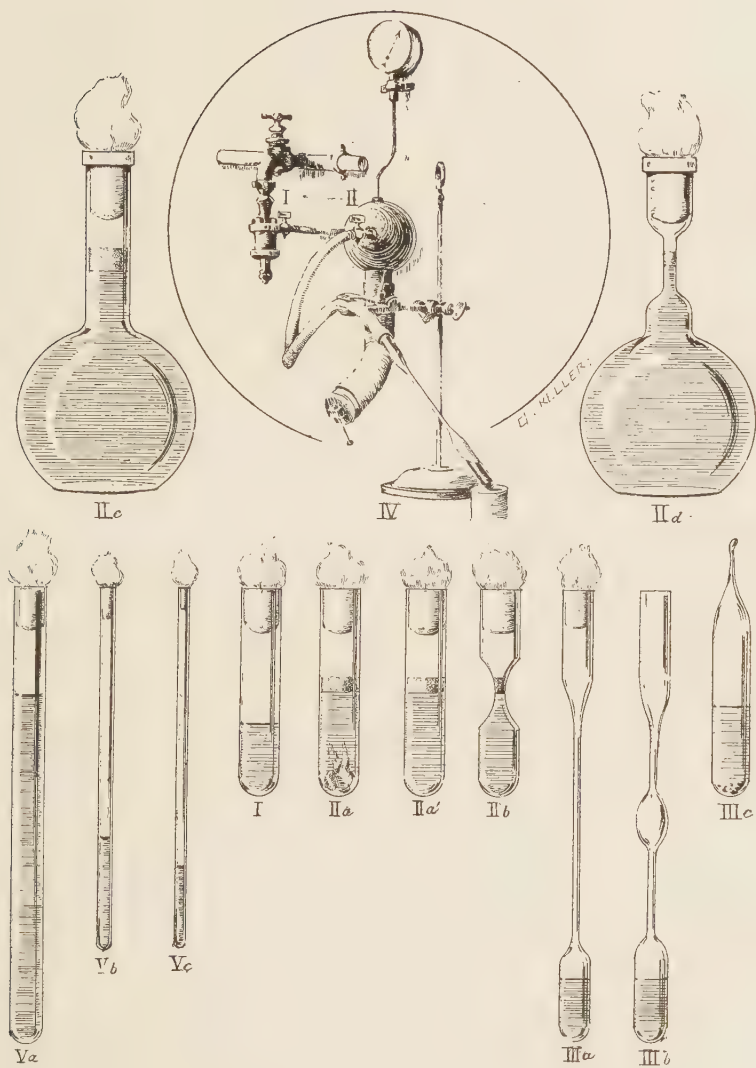


TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION. — <i>Plan du travail</i>	3
--	---

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE

A. — Procédés de culture.	5
1° Le tube de Liborius-Veillon	6
2° Le procédé de la boîte de Pétri.	7
3° Tube cacheté et tube cacheté étranglé.	8
4° Le tube d'Achalme, tube de conservation.	12
B. — Technique spéciale de l'aérobisation des anaérobies.	13
I. — <i>Mensuration de l'anaérobiose.</i>	13
1° Par variation de pression	13
2° Par cultures en tubes profonds.	15
II. — <i>Aérobisation proprement dite</i>	17
1° Par gamme ascendante de pression.	17
2° Par gamme descendante de hauteur.	18
3° Par délanolisation.	19
4° Par culture en gélatine des anaérobies liquéfiantes.	19
III. — <i>La méthode de culture des anaérobies de Tarozi, étude analytique et critique.</i>	20

DEUXIÈME PARTIE

RELATION DES EXPÉRIENCES FAITES AVEC LES DIFFÉRENTS MICROBES

A. — Vérification de pureté et contrôle des cultures. .	22
B. — Le bacille d'Achalme ou bacillus perfringens. .	24
I. — <i>Caractères classiques.</i>	24

II. — <i>Expériences originales.</i>	27
1° Mensuration de l'anaérobiose.	27
a. Par gamme ascendante de pression.	27
b. Par échelle de tubes profonds.	28
2° L'aérobisation et ses trois étapes. Valeur de la sporulation aérobie et de l'anaérobiose de reconstitution.	29
3° Tubes étroits.	35
4° Cultures sur gélatine.	37
5° Expériences sur les animaux.	39
6° Existe-t-il une quatrième étape?	41
III. — <i>L'identité du bacille d'Achalme et du bacille de Thioloix.</i> . .	41
C. — Le vibron septique.	
I. — <i>Caractères classiques.</i>	43
II. — <i>Expériences originales.</i>	46
1° Mensuration de l'anaérobiose.	46
2° L'aérobisation et ses trois étapes. Valeur de la sporulation aérobie et de l'anaérobiose de reconstitution.	47
3° Cultures sur gélatine.	52
4° Les tubes étroits.	53
5° Expériences sur les animaux. Allobi-vaccination du cobaye. .	54
6° L'agglutination du vibriogène septique par le sérum Leclainche.	55
III. — <i>Rapports du vibron septique et de la Bactérie septique aérobie de Legros.</i>	56
D. — Le bacille gracile éthylogène.	
I. — <i>Sa description (Achalme et G. Rosenthal).</i>	58
II. — <i>Expériences d'aérobisation.</i>	60
E. — Le bacille du tétanos.	
I. — <i>Caractères classiques.</i>	62
II. — <i>Expériences originales.</i>	66
1° La moindre anaérobiose du bacille du tétanos.	66
2° Mensuration de l'anaérobiose et aérobisation.	68
3° Culture sur gélose inclinée.	71
4° Les 3 stades de l'aérobisation. Valeur de l'anaérobiose de re- constitution et de la sporulation aérobie.	72
5° L'agglutinabilité par le sérum antitétanique du bacillogène tétanique.	74
F. — Vérification sur d'autres germes. Rappel des recherches de Kitt sur le charbon symptomatique	77

TROISIÈME PARTIE
LES GRANDS FAITS BIOLOGIQUES QUI RÉSULTENT
DE L'AÉROBISATION

A. — Critique de l'hypothèse d'une contamination des tubes.	78
B. — Fin de la séparation des microbes en aérobies et anaérobies.	79
C. — Les lois de l'aérobisation	83
1° Constance de la mensuration	83
2° Évolution en trois étapes.	83
3° L'anaérobie de reconstitution.	84
4° Les races nouvelles de la sporulation aérobie.	85
5° La perte du pouvoir pathogène et ses conséquences.	85
D. — L'allobisme, méthode d'immunisation.	89
E. — Bacilles et bacillogènes	90
1° L'origine des anaérobies pathogènes	90
2° Ya-t-il dans nos expériences un fait de transformisme microbien?	91
CONCLUSIONS.	93
Appendice.	95

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

ZOOLOGIE. — Les Flagellates parasites de l'homme et des animaux.

GÉOLOGIE. — Les eaux souterraines et leur rôle dans l'alimentation des agglomérations en eau potable.

Vu et approuvé :

Paris, le 15 août 1907.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,
P. APPELL.

Vu et permis d'imprimer.

Paris, le 15 août 1907.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
L. LIARD.

COULOMMIERS

Imprimerie PAUL BRODARD.
